



Construction et analyse de mutants de la machinerie de photoproduction d'hydrogène chez la cyanobactérie modèle *Synechocystis*

Marcia Ortega Ramos Ortega-Ramos

► To cite this version:

Marcia Ortega Ramos Ortega-Ramos. Construction et analyse de mutants de la machinerie de photoproduction d'hydrogène chez la cyanobactérie modèle *Synechocystis*. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA112001 . tel-01124220

HAL Id: tel-01124220

<https://theses.hal.science/tel-01124220>

Submitted on 6 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université PARIS-SUD
ÉCOLE DOCTORALE : Gènes, Génomes, Cellules

THESE DE DOCTORAT
MENTION : Biologie

Soutenue le 13/01/2014
Par :

Marcia ORTEGA-RAMOS

**Construction et analyse de mutants de la
machinerie de photoproduction d'hydrogène chez la
cyanobactérie modèle *Synechocystis***

Composition du jury:

Directeur de thèse: Dr. Franck CHAUVAT

Président du jury: Pr. Fabrice CONFALONIERI

Rapporteurs: Dr. Laetitia PIEULLE

..... Dr. Soufian OUCHANE

Examineurs : Dr. Laurent CURNAC

Remerciement

Pour commencer je remercie Franck et Corinne de m'avoir accueillie au sein de leur équipe et de m'avoir permis de participer à ce projet de recherche passionnant. Je tiens à remercier Franck de m'avoir fait confiance, de m'avoir guidé et conseillé. J'ai beaucoup apprécié son aide et sa grande disponibilité tout au long de ma thèse. Je remercie également Corinne pour son aide et ses conseils, qui m'ont permis d'avancer et m'ont beaucoup encouragé.

Special thanks to Panatda and Kae, always patient and nice to me, who showed me everything especially to smile. I'm grateful for their support, their friendship and the delicious meals you cooked.

Merci à Aurélia et Hervé que j'ai tellement fait travailler, grâce à vous le projet est allé au delà de mes espérances, mais surtout grâce à votre soutien et votre aide précieuse.

Mes remerciements chaleureux à toute mon équipe pour tous les bons moments passés ensemble, leur aide et leur soutien. Je suis ravie d'avoir intégré une équipe aussi fantastique et soudée, avec qui j'ai passé des moments mémorables.

Je tiens à remercier tout particulièrement Jérémy, Emilie, Sam, Sandrine et Theo qui sont devenus plus que des collègues et m'ont tellement soutenu dans mes périodes de doute. Je garde un souvenir inoubliable de nos débats enflammés à la cantine, qui me manque encore.

Je remercie chaleureusement les personnes géniales que j'ai rencontré au cours de ma thèse et qui m'ont aidé à un moment ou un autre, sans qui je n'aurais pas passée trois années si agréables.

Je remercie également mon comité de thèse pour leur écoute attentive et leurs conseils, en particulier à Ghada pour ses encouragements et sa bonne humeur qui m'ont toujours aidé déstressée.

Un grand merci à mon jury de thèse : Laetitia Pieulle, Soufian Ouchane, Fabrice Confalonieri et Laurent Cournac.

Mes remerciements ne seraient pas complets sans remercier mes amis d'être là pour moi. Un « saha » spécial à Meriem une amie fidèle et chaleureuse, sur qui j'ai toujours pu compter. Merci pour toutes ces soirées à m'écouter qui m'ont toujours remonté le moral.

Merci ma petite Ríass pour toutes les pages de corrections et nos repas pleins de petits potins. Merci également à Adrien qui toujours avec un grand sourire m'a aidé pendant des heures à imprimer mon manuscrit.

Gracias à Julien, cariño de mis cariños, pour son soutien inconditionnel à tout moment et son aide précieuse.

At last but not least, a mis papas por su amor y apoyo, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí, son mi mayor inspiración y me siento orgullosa de ser su hija.

Gracias la mejor de las abuelitas, por su amor, nunca te olvidare y cuando me siento sola sé que siempre estas allí cuidándome.

Gracias a mi hermano y a toda mi familia que son tan importantes para mí y que extraño tanto.

A mí Madre, mi Padre y mi Abuelita

Avant propos

CONTEXTE

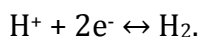
La recherche présentée dans cet ouvrage est le fruit de trois années de doctorat au CEA de Saclay au sein du laboratoire LBBC, sous la direction de Franck Chauvat.

Le contexte de cette thèse s'inscrit dans les enjeux énergétiques et environnementaux actuels. De nos jours, les principales sources d'énergies utilisées : fossiles (pétrole, gaz, et charbon) ou nucléaire (uranium), existent en quantités limitées. Pour répondre à ces problèmes, la recherche et le développement de nouvelles énergies propres, rentables et durables sont devenus des enjeux importants.

Le dihydrogène (H_2), très abondant sur notre Planète riche en eau (H_2O), est une source d'énergie attrayante car elle est renouvelable, propre (sa combustion ne génère que de l'eau), et plus énergétique que le pétrole (142 MJ/kg pour H_2 vs. 44.2 MJ/kg pour le pétrole) ou le gaz naturel (Maeda *et al.*, 2008). Acquérir la capacité à produire de l'hydrogène de façon propre et rentable est un enjeu actuel important.

La photoproduction de H_2 par voie biologique utilise l'énergie solaire (propre et quasi-inépuisable) et l'eau, sans dégagement de gaz à effet de serre.

Les cyanobactéries sont capables d'effectuer à la fois la photosynthèse qui utilise l'énergie solaire et l'eau, et la production d'hydrogène grâce à leurs enzymes hydrogénases qui catalysent la réaction :



Cependant, la machinerie cellulaire de production de l'hydrogène est mal connue, peu abondante et peu active dans les conditions normales de croissance photoautotrophique. Pour espérer l'améliorer, il est nécessaire de l'étudier de façon approfondie, pour nous permettre de mieux comprendre la place et le rôle de la production d'hydrogène dans la physiologie et le métabolisme cyanobactérien.

OBJECTIF

La découverte de nouvelles énergies renouvelables ouvre la voie non seulement au développement de procédés biotechnologiques originaux mais aussi à la compréhension fondamentale de mécanismes d'adaptation des microorganismes. La machinerie de photoproduction d'hydrogène chez la cyanobactérie modèle *Synechocystis* est encore peu connue mais pourrait intervenir dans l'adaptation de *Synechocystis* face à des changements environnementaux.

L'objet de cette thèse a été de contribuer à l'étude de la machinerie de photoproduction d' H_2 chez *Synechocystis*, afin de mieux comprendre cette machinerie, ses verrous biologiques et particulièrement son rôle biologique, pour à terme améliorer la production d'hydrogène.

ORGANISATION DU MANUSCRIT

Ce manuscrit se décline en quatre parties

- Une introduction générale, composée de 5 chapitres ;
- Une première partie constituée de mon premier article en première auteur, suivie de résultats complémentaires ;
- Une deuxième partie sur l'étude de deux autres articles auxquels j'ai participé, suivie de résultats complémentaires ;
- Pour finir une conclusion générale et les perspectives qui en ressortent.

Première partie : Introduction générale:

Le premier chapitre aborde brièvement la molécule de dihydrogène, son utilisation dans de nombreux domaines et ses caractéristiques énergétiques qui ouvriraient la voie pour de nouvelles énergies renouvelables. Il y sera également évoqué la difficulté de son stockage dû à sa petite taille et sa production en se focalisant sur la production par voie biologique.

Le deuxième chapitre traite des enzymes liées au métabolisme de l'hydrogène. Dans cette partie, les nitrogénases seront décrites succinctement, tandis que le chapitre mettra l'accent sur les hydrogénases, et en particulier les hydrogénases à centre actif [NiFe] qui font l'objet de cette thèse.

Le troisième chapitre expose la diversité et les caractéristiques des cyanobactéries. Elle dévoile notamment les particularités de *Synechocystis*, la cyanobactérie modèle utilisée durant mes travaux de thèse. Cette partie décrit également la photosynthèse chez les cyanobactéries et ses principaux acteurs.

Le quatrième chapitre met l'accent sur l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis*. Les connaissances actuelles sur les particularités de cette hydrogénase et de sa maturation seront exposées. Pour finir, les hypothèses concernant le rôle de l'hydrogénase bidirectionnelle au début de mes travaux de thèse seront listées.

Le dernier chapitre est une synthèse bibliographique sur le stress oxydant et les dommages spécifiques sur les cyanobactéries car comme on le verra plus loin l'hydrogénase est impliquée dans la gestion du stress oxydant.

Deuxième partie : Résultats de l'article I

Dans cette partie, j'exposerai les premiers résultats obtenus au cours de ma thèse, qui ont pour objectif de mieux comprendre le rôle de l'hydrogénase, ainsi que les verrous biologiques de la production d'hydrogène chez *Synechocystis*, pour à terme améliorer la production d'hydrogène.

Le premier article dont je suis premier auteur, présente la construction de 8 souches mutantes de *Synechocystis* soit dépourvus des gènes *hox* qui codent pour une hydrogénase pentamérique chez *Synechocystis*, soit surproduisant simultanément l'hydrogénase et divers protéines impliquées dans sa maturation de manière thermorégulée ou constitutivement. L'analyse de ces mutants révèle de nombreuses

étapes limitantes dans la production d'hydrogène qui sont levées au fur et à mesure, pour finalement obtenir un gain d'activité hydrogénase 17 fois supérieur. Plusieurs résultats obtenus nous permettent également de démontrer un rôle biologique de l'hydrogénase bidirectionnelle qui agit comme une protection contre le stress oxydant chez *Synechocystis*.

A la suite de cet article, sont exposés les résultats complémentaires non publiés de cette partie notamment l'influence du gène *hoxW* qui code pour la protéase qui mature la sous unité HoxH de l'hydrogénase.

Troisième partie : Résultats de l'article II et III

Cette partie présente les deux articles dont je suis co-auteur qui traitent de l'identification d'AbrB2, un régulateur négatif de l'expression de l'hydrogénase bidirectionnelle chez *Synechocystis* et du mécanisme de sa régulation post-traductionnelle.

Dans le premier article nous avons caractérisé chez la souche sauvage de *Synechocystis* PCC6803 le régulateur AbrB2 qui fait partie de la superfamille des protéines CyAbrB. L'utilisation d'une combinaison d'approches (délétion de gènes, Fusion transcriptionnelles, retard sur gel, qRT PCR, Mesure d'activité hydrogénase) nous a permis de montrer qu'AbrB2 agit comme un répresseur du promoteur de l'opéron *hox* qui code pour l'hydrogénase.

Le deuxième article dont je suis également co-auteur décrit pour la première fois chez les cyanobactéries qu'AbrB2 peut être soumis à une régulation post-traductionnelle la glutathionylation qui module son activité régulatrice. Nous montrons également que ce régulateur intervient dans la tolérance au stress disulfide (diamide) ou induit par le nickel.

A la suite, des résultats préliminaires complémentaires traitent de la construction d'une souche dépourvue d'AbrB2 et surexprimant les gènes de l'hydrogénase.

Quatrième partie : Conclusion et Perspectives

Cette dernière partie est composée d'une conclusion qui résume les résultats obtenus au cours de mes travaux de Thèse ainsi qu'une partie des perspectives qui propose quelques idées pour continuer à caractériser le métabolisme de photoproduction d'hydrogène chez les cyanobactéries.

En conclusion, l'ensemble de mes travaux a permis de lever des verrous biologiques permettant de produire plus d'hydrogénase fonctionnelle dans *Synechocystis* PCC6803 et donc d'augmenter la capacité à produire de l'hydrogène. Ceci a aussi permis de mieux comprendre le rôle de l'hydrogénase dans le métabolisme cyanobactérien notamment dans la gestion du stress oxydant.

PLAN

Remerciement	3
Avant propos	7
CONTEXTE	7
OBJECTIF	7
ORGANISATION DU MANUSCRIT	8
<i>Première partie : Introduction générale</i>	<i>8</i>
<i>Deuxième partie : Résultats de l'article I</i>	<i>8</i>
<i>Troisième partie : Résultats de l'article II et III</i>	<i>9</i>
<i>Quatrième partie : Conclusion et Perspectives.....</i>	<i>9</i>
Plan	11
INTRODUCTION	22
Chapitre I: L'Hydrogène.....	25
POURQUOI S'INTERESSE-T-ON A L'HYDROGENE COMME SOURCE	
D'ENERGIE?	25
CARACTERISTIQUES	26
APPLICATIONS DE L'HYDROGENE.....	26
STOCKAGE DE L'HYDROGENE	27
PRODUCTION D'HYDROGENE	27
PRODUCTION INDUSTRIELLE	27
PRODUCTION D'HYDROGENE PAR DES MICRO-ORGANISMES	28
<i>La fermentation obscure</i>	<i>28</i>
<i>Photo-fermentation</i>	<i>28</i>
<i>Bio-photolyse de l'eau : algues et cyanobactéries</i>	<i>29</i>
<u>Bio-photolyse directe</u>	<u>29</u>
<u>Bio-photolyse indirecte</u>	<u>29</u>
<i>Le système hybride utilisant les bactéries photosynthétiques et anaérobiques</i>	
.....	30

Chapitre II : Présentation des enzymes liées au métabolisme de l'hydrogène 31

HISTORIQUE 31

NITROGENASE 31

HYDROGENASE 33

GENERALITES 33

HYDROGENASE Fe 34

HYDROGENASE Fe-Fe 35

Structure et site actif..... 35

Caractéristiques 36

Partenaires physiologiques 36

Maturation et assemblage..... 36

HYDROGENASE Ni-Fe (INCLUANT NiFeSe) 38

Structure et Site actif 38

Classification, caractéristiques et partenaires physiologiques 39

Groupe I : Hydrogénases 'Uptake' à NiFe 40

Groupe II : Hydrogénase Uptake à NiFe cyanobactérienne et Hydrogénase senseurs d'H₂ 40

Groupe III : Hydrogénase bidirectionnelle hétéromultimériques cytoplasmiques 41

Groupe IV : Hydrogénase NiFe respiratoire membranaire génératrice d'H₂ 41

Origine des hydrogénases eucaryotes 42

Assemblage des hydrogénases NiFe 42

Régulation des hydrogénases NiFe..... 44

Activation des hydrogénases NiFe..... 44

Chapitre III : Propriété de la cyanobactérie modèle *Synechocystis* PCC6803 et la Photosynthèse 45

PRESENTATION DES CYANOBACTERIES.....	45
ORIGINES	45
DIVERSITE	46
<i>Ecologique</i>	47
<i>Morphologie et physiologie</i>	47
CARACTERISTIQUES	49
CLASSIFICATION	49
<i>Générale</i>	49
<i>Des cyanobactéries</i>	50
POTENTIEL BIOTECHNOLOGIQUE	51
SYNECHOCYSTIS PCC6083.....	53
CARACTERISTIQUES ET PHYSIOLOGIE.....	53
GENETIQUE	54
CULTURE.....	54
INTERET BIOTECHNOLOGIQUE	54
PHOTOSYNTHESE	55
GENERALITE	55
PHOTOSYNTHESE CHEZ LES CYANOBACTERIES	55
LES THYLAKOÏDES	56
LES PHYCOBILISOMES	56
LA CHLOROPHYLLE ET LES CAROTENOÏDES	57
LE PHOTOSYSTEME II.....	57
LE COMPLEXE CYTOCHROME B6/F.....	58
L'ATP SYNTHASE	58
LE PHOTOSYSTEME I.....	58

LA FERREDOXINE / FLAVODOXINE	59
------------------------------------	----

BILAN SUR LA PHOTOSYNTHESE	59
----------------------------------	----

Chapitre IV : L'hydrogénase bidirectionnelle Hox

HYDROGENASE BIDIRECTIONELLE HOX.....	61
--------------------------------------	----

LE METABOLISME DE L'HYDROGENE CHEZ CERTAINES CYANOBACTERIES	61
---	----

L'HYDROGENASE BIDIRECTIONNELLE HOXEFUYH	61
---	----

<i>Histoire</i>	61
-----------------------	----

<i>Généralités</i>	61
--------------------------	----

<i>Caractéristiques et structure</i>	62
--	----

<i>Transcription</i>	63
----------------------------	----

<i>Région génomique des gènes hoxEFUYH</i>	63
--	----

<i>Influence du milieu sur le niveau de transcription</i>	64
---	----

<i>Les Régulateurs transcriptionnels de l'opéron hox</i>	64
--	----

<i>Traduction de l'ARN hox et localisation de l'hydrogénase</i>	65
---	----

<i>Assemblage du site actif et maturation de l'hydrogénase</i>	65
--	----

<i>Maturation de la grande sous-unité</i>	66
---	----

<i>Les protéines HypABCDEF imoiquées dans l'assemblage du centre NiFe</i>	67
--	----

<i>La protéase HoxW</i>	68
-------------------------------	----

<i>Maturation de la petite sous-unité HoxY</i>	69
--	----

<i>Rôle biologique de l'hydrogénase</i>	69
---	----

<i>La respiration</i>	69
-----------------------------	----

<i>Rôle dans la fermentation</i>	70
--	----

<i>Maintien du pool de NAD(P)H</i>	70
--	----

<i>Régulateur redox</i>	71
-------------------------------	----

<i>Valve à électrons pendant la photosynthèse</i>	72
---	----

Chapitre V : Le stress oxydant, le paradoxe de la vie aérobie	73
GENERALITES	73
ORIGINES DU STRESS OXYDATIF	73
LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE	73
GENERALITES	73
CARACTERISTIQUES	74
CONSEQUENCES	75
LES MECANISMES DE DETOXICATION	76
LE GLUTATHION	76
LES ENZYMES ANTI-OXYDANTES.....	76
<i>Superoxyde Dismutase (SOD) et Superoxyde Réductase (SOR).....</i>	<i>76</i>
<i>Peroxydase et catalases.....</i>	<i>77</i>
REGULATION DES REPONSES AU STRESS OXYDATIF	77
LE STRESS OXYDANT CHEZ LES CYANOBACTERIES	78
LES DOMMAGES SPECIFIQUES	78
<i>Photo-inhibition.....</i>	<i>78</i>
<i>Dégradation des phycobilisomes.....</i>	<i>78</i>
LES DEFENSES	78
<i>Dissipation de l'énergie.....</i>	<i>78</i>
<i>Les antioxydants non enzymatiques.....</i>	<i>80</i>
CONCLUSION	80
RESULTATS	83
Article I.....	85
OBJECTIF	85
RESULTATS.....	85
1. <u>L'opéron hoxEFUYH n'est pas nécessaire à la viabilité cellulaire.....</u>	

2. La surexpression thermorégulée de l'opéron hox n'affecte pas la croissance cellulaire.....
3. L'optimisation du milieu par ajout de nickel améliore l'activité hydrogénase
4. La surexpression thermorégulée des gènes hox et hyp permet d'augmenter l'activité hydrogénase.....
5. La surexpression constitutive de l'opéron hox n'affecte pas la croissance cellulaire
6. La surexpression constitutive des gènes hox et hyp permet d'augmenter l'activité hydrogénase
7. L'hydrogénase joue un rôle de protection contre le stress oxydant de type H_2O_2
8. L'hydrogénase joue un rôle de protection contre le stress oxydant de type glucose/glycerol

DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....89

Résultats complémentaires de l'article I 131

CONSTRUCTION D'UN MUTANT QUI SUREXPRIME L'OPERON

HOXEFUYH ET LE GENE HOXW 131

OBJECTIF 131

RESULTATS 131

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 136

CONSTRUCTION D'UN MUTANT QUI SUREXPRIME L'OPERON

HOXEFUYH, LES GENES HYPABCDE ET LE GENE HOXW..... 137

OBJECTIF..... 137

RESULTATS 137

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 140

Article II 143

OBJECTIF 143

RESULTATS..... 143

DISCUSSION ET PERSPECTIVES..... 144

Article III.....	161
OBJECTIF	161
RESULTATS.....	161
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	163
Résultats complémentaires des articles II et III .	
CONSTRUCTION D'UN MUTANT DE DELETION DU REPRESSUER ABRB2 QUI SUREXPRIME L'OPERON <i>HOXEFUYH</i>	175
OBJECTIF	175
RESULTATS	175
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	176
Conclusions et Perspectives.....	183
CONCLUSION.....	185
PERSPECTIVES	191
Matériels et Méthodes.....	197
MATERIELS.....	199
SOUCHES ET MILIEUX DE CULTURE	199
<i>Synechocystis sp. PCC6803</i>	199
<i>Souches E. coli</i>	199
PLASMIDES	200
<i>pGEM-T</i>	200
<i>pUC19</i>	200
<i>pFCI</i>	201
METHODES	202
BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	202
<i>Resuspension et dosage des acides nucléiques</i>	202

<i>Extraction et purification d'acides nucléiques.....</i>	202
<i>Extraction d'ADN plasmidique d'E. coli.....</i>	202
<i>Extraction d'ADN génomique de Synechocystis.....</i>	202
<i>Extraction des ARN totaux de Synechocystis</i>	202
AMPLIFICATION D'ADN PAR REACTION DE POLYMERISATION EN CHAÎNE (PCR). 202	
PCR D'ASSEMBLAGE	203
PCR QUANTITATIVE (RT-QPCR)	203
<i>Synthèse des ADN complémentaires</i>	203
<i>Préparation de la qPCR</i>	203
PURIFICATION D'UN FRAGMENT ADN	204
<i>Par purification sur colonne</i>	204
<i>Par purification sur gel d'agarose</i>	204
LIGATION - TRANSFORMATION PAR CHOC THERMIQUE CHEZ E. COLI.....	204
REACTION DE SÉQUENCE	205
MANIPULATION GÉNÉTIQUES	205
TRANSFORMATION ET INACTIVATION DE GÈNE CHEZ SYNECHOCYSTIS	205
<i>Principe.....</i>	205
<i>Protocole</i>	205
CONJUGAISON DE PLASMIDE CHEZ SYNECHOCYSTIS	206
<i>Principe</i>	206
<i>Protocole</i>	206
BIOCHIMIE	207
<i>Purification des protéines et dosage de protéines</i>	207
<i>Extraction totale</i>	207
<i>Dosage des protéines par la méthode de Bradford</i>	207
<i>Purification au TCA</i>	208
WESTERN BLOT	208
<i>Migration des protéines sur gel SDS-PAGE</i>	208
<i>Transfert sur membrane de nitrocellulose</i>	208

<i>Hybridation des anticorps</i>	208
ACTIVITE HYDROGENASIQUE	209
<i>Principe</i>	209
<i>Protocole</i>	209
TESTS PHENOTYPIQUES	210
<i>Test de tolérance aux métaux et aux agents oxydants</i>	210
<u><i>Sur milieu solide</i></u>	210
<u><i>Courbe de croissance en milieu liquide</i></u>	210
<i>Test de survie en anaérobie</i>	210
<i>Analyse globale des pigments de Synechocystis PCC6803</i>	211
Références	213
Annexe	223
Résumé	230

INTRODUCTION

Chapitre 1 : L'hydrogène

**Chapitre 2 : Présentation des enzymes liées
au métabolisme de l'hydrogène**

**Chapitre 3 : Propriétés de la cyanobactérie
modèle *Synechocystis* PCC6803 et la
photosynthèse**

**Chapitre 4 : L'hydrogénase bidirectionnelle
Hox**

Chapitre 5 : Les stress oxydant

Chapitre I : L'Hydrogène

POURQUOI S'INTERESSE-T-ON A L'HYDROGENE COMME SOURCE D'ENERGIE?

CARACTERISTIQUES

L'atome d'hydrogène (H) est composé d'un noyau (contenant un proton) et d'un électron, c'est l'élément chimique le plus simple, ne pouvant former qu'une liaison covalente. C'est également l'atome le plus léger, ne pesant que 1g par mole (1mole = N Avogadro = $6,02 \cdot 10^{23}$ molécules).

Il existe trois isotopes principaux de l'hydrogène (**Figure 1**):

- le protium ^1H (hydrogène léger): le plus abondant (99,988% de tout l'hydrogène)
- le deutérium ^2H : isotope stable (0,012%)
- le tritium ^3H : isotope instable et radioactif (traces), utilisé pour les bombes à fission nucléaire.

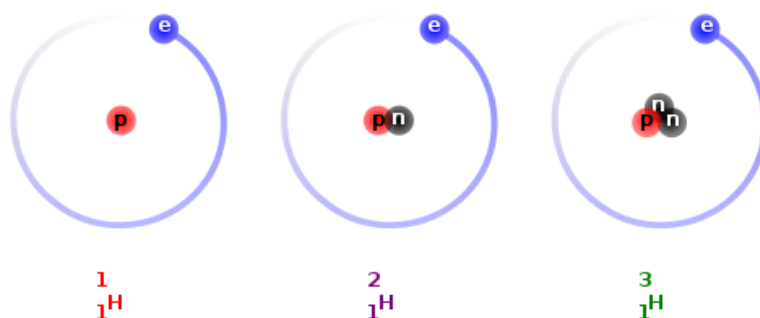


Figure 1 : Représentation des isotopes naturels de l'hydrogène

Le composé le plus simple de l'hydrogène est la molécule de dihydrogène H_2 (composée de deux atomes d'hydrogène) qui pèse 2g/mol. Cette molécule d'hydrogène est la molécule la plus ancienne de notre univers. Elle fut découverte par Cavendish au 18^e siècle et permit de déterminer pour la première fois la composition de l'eau. En effet l'hydrogène est très abondant sur Terre mais se trouve principalement sous la forme de composés chimiques comme l'eau (H_2O) ou les hydrocarbures C_nH_m , ou autres molécules plus complexes.



Dans l'Univers, l'hydrogène est l'atome le plus abondant (75% en masse et 92% en nombre d'atomes) mais sur Terre ce n'est que le 16^{ème} (0,03%) en masse et le 8^{ème} en nombre (0,67%) plus abondant. Dans l'atmosphère terrestre le dihydrogène ne représente qu'un volume de 0,55 ppmv des gaz atmosphériques. Ce faible taux s'explique par la légèreté de cette molécule, ainsi le champ gravitationnel ne peut la retenir et elle s'échappe constamment de l'atmosphère.

Le dihydrogène H_2 (par la suite appelé hydrogène) possède des avantages énergétiques : sa combustion produit la plus grande énergie massique de tous les carburants (141,86 kJ/g pour H_2 contre 47,5kJ/g pour le gazole-diesel par exemple) et cette combustion est propre puisqu'elle ne génère que de l'eau, sans émission de CO_2 . De plus, elle possède l'avantage de pouvoir être utilisée comme stockage de l'énergie (ce qui n'est pas possible avec l'électricité). Cependant au point de vue volumique, elle possède la plus faible densité volumique d'énergie (10050 kJ/m³ en tant que gaz et 8491 MJ/m³) : elle a donc besoin d'un volume plus important tout en étant plus légère.

APPLICATIONS DE L'HYDROGENE



La consommation mondiale d'hydrogène est aujourd'hui d'environ 50 millions de tonnes par an. La principale utilisation de l'hydrogène se fait dans l'industrie chimique (synthèse d'ammoniac) et pétrochimique (raffinage et désulfuration du pétrole pour obtenir des carburants propres). Il est également utilisé dans de nombreux secteurs industriels pour fabriquer des fibres textiles, dans l'industrie du verre, l'électronique, la métallurgie...

Grâce à sa grande énergie massique lors de sa combustion, l'hydrogène est utilisé comme carburant dans des moteurs à explosion pour générer de l'énergie mécanique (ex : aéronautique). Mais le problème majeur reste le stockage de l'hydrogène à cause de son volume et sa volatilité.

Il peut également être utilisé dans les piles à combustible (piles à hydrogène) pour produire de l'énergie. La production d'énergie se fait grâce à l'oxydation de l'hydrogène catalysé par du platine sur l'anode, couplée à la réduction de l'oxygène catalysé par du nickel (ou autre catalyseur) sur la cathode. Cette production est propre car elle ne produit que de l'eau et ne consomme que des gaz. Cependant, cette technologie se heurte à certaines limites : le besoin d'un réservoir de combustible approprié ainsi que le coût des matériaux utilisés (membrane de polymère – très coûteuse ; catalyseurs de platine – coûteux et rare).

L'hydrogène peut aussi être utilisé comme vecteur d'énergie, afin de stocker chimiquement l'énergie dans une molécule et la libération d'énergie serait propre sans émissions de CO_2 . Ce qui nous amène aux techniques de stockage.

STOCKAGE DE L'HYDROGENE

L'hydrogène étant la plus petite molécule, elle occupe un volume important et peut s'échapper facilement de son réservoir. De plus, des phénomènes de corrosion sont observés dus à la tendance naturelle de l'hydrogène à faire des liaisons chimiques.

Actuellement plusieurs techniques existent pour stocker l'hydrogène :



- le stockage sous forme gazeuse sous haute pression, mais nécessite beaucoup d'énergie pour la compression ;
- le stockage sous forme liquide cryogénique, mais nécessite des réservoirs à isolation thermique très importants ;
- le stockage en hydrures métalliques sous basse pression, nécessite un hydrogène très pur.

De nos jours le stockage et le transport du dihydrogène sont devenus des enjeux technologiques pour de nombreuses industries, qui ne cessent de l'améliorer. Mais comment est produit l'hydrogène?

PRODUCTION D'HYDROGENE

PRODUCTION INDUSTRIELLE

Comme décrit précédemment, sur Terre l'hydrogène n'est pas disponible à l'état naturel. Aujourd'hui, la principale filière de production d'hydrogène est issue d'énergies fossiles comme le gaz naturel ou le pétrole, c'est le vaporéformage (réformage des combustibles fossiles à la vapeur d'eau). Cette technique permet de casser la molécule de méthane CH_4 avec la vapeur d'eau à très haute température, ce qui produit de l'hydrogène H_2 et du dioxyde de carbone CO_2 . Cette méthode est la plus économique (même si par rapport au gaz naturel son prix est trois fois plus élevé) mais elle est polluante par le rejet de CO_2 .

La gazéification du charbon et de la biomasse est une autre technique, mais elle est également émettrice de CO_2 . (Clefs CEA n°50/51-Hiver2004/2005)

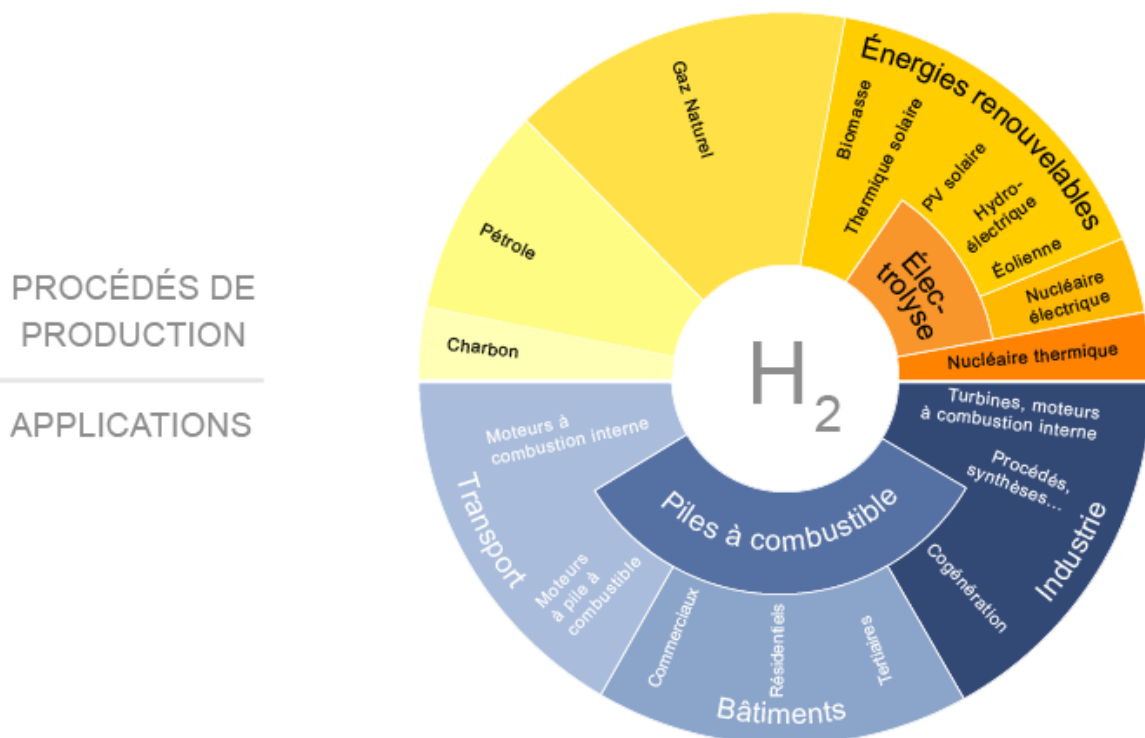


Figure 2 : Schéma représentatif des procédés de production d'hydrogène et ses applications de nos jours. D'après AFH₂-UE 2011

Une autre méthode utilisée pour la production d'hydrogène est l'électrolyse de l'eau. Elle se fait grâce à un courant électrique ou par une succession de réaction chimiques. L'électrolyse de l'eau va casser la molécule d'eau pour produire de l'hydrogène H₂ et de l'oxygène O₂. C'est une technique propre sans rejet direct de CO₂ mais elle nécessite un apport important d'électricité. Elle est généralement associée à des sources électriques à faible coût (ex: éoliennes) ou pour stocker l'énergie (barrages isolés), ou utilisée pour obtenir un hydrogène très pur (AFH₂-2004).

La production d'hydrogène par une méthode propre, durable et économique est devenue un challenge dans notre société de plus en plus demandeuse en énergie et amène à diversifier les méthodes de production. Toutes les filières présentées précédemment ont recours à des ressources fossiles polluantes et épuisables ou sont très énergivores, et ne répondent pas à ces critères (**Figure 2**).

De nouvelles voies sont en cours d'élaboration dont la production biologique d'hydrogène qui serait une filière prometteuse, qui rejoint les critères cités précédemment puisqu'elle peut s'effectuer dans des conditions ambiantes, ne nécessite aucun apport énergétique et elle est sans danger pour l'environnement. Cependant, ces nouvelles voies sont encore en plein développement et dans les conditions naturelles la production d'hydrogène est faible. Pour une production propre et durable par des systèmes biologiques, une compréhension approfondie et une amélioration des mécanismes biologiques encore peu connus et peu productifs est nécessaire.

La suite va se focaliser sur ces bioproductions d'hydrogène par le vivant et en particulier par des microorganismes.

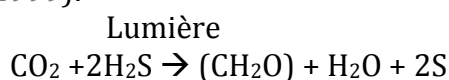
PRODUCTION D'HYDROGENE PAR DES MICRO-ORGANISMES

La fermentation obscure

Elle consiste à fermenter des composés organiques grâce à la coopération de différentes populations de bactéries (ex: *Clostridium*, *Enterobacter*, *Bacillus*). Le système est constitué de bactéries hydrolytiques qui hydrolysent des polymères à partir de biomasse (sucres, déchets organiques, résidus forestiers) puis des bactéries acidogènes qui forment des acides gras volatiles, de l'hydrogène H₂ et du CO₂ (Pandu and Joseph, 2012). C'est une des techniques les moins développées car les sucres sont coûteux, cependant elle s'est développée dernièrement pour valoriser les déchets organiques ou résidus forestiers. Par contre, pour certains matériaux (ex: ligno-cellulosiques), un prétraitement doit être effectué car ils sont difficiles à digérer par les bactéries, ce qui ajoute un coût supplémentaire au processus. De plus un autre problème vient des bactéries présentes dans le consortium qui convertissent l'hydrogène en acétate et méthane.

Photo-fermentation

C'est le principe de fermentation à la lumière réalisée par certaines bactéries photosynthétiques (ex: bactéries pourpres non sulfureuses). Ces bactéries effectuent la photosynthèse non-oxygénique au cours de laquelle elles utilisent du soufre ou des composés organiques comme donneurs d'électrons et l'énergie lumineuse à la cellule selon la réaction (Raven *et al.*, 1999):



Cette réaction se fait dans des conditions d'anaérobie car la synthèse des pigments (bactériochlorophylle, collecteur de lumière) est inhibée par l'oxygène. Les électrons et l'ATP fournis par la photosynthèse vont permettre aux enzymes « nitrogénases » d'assimiler le N₂ et de produire de l'hydrogène en conditions de carence en azote (ces enzymes seront décrites dans le chapitre suivant).

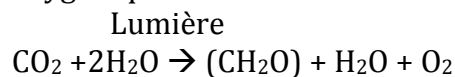
Cette technique est prometteuse car l'efficacité de conversion de l'énergie lumineuse est plus importante que pour les cyanobactéries, elle n'induit pas l'inhibition des enzymes par l'O₂ et possède une large fenêtre de capture de la lumière (400 nm à 950 nm). Cependant, les nitrogénases requièrent un nombre important d'ATP pour fixer l'azote, ce qui rend cette méthode peu avantageuse.

Bio-photolyse de l'eau : algues et cyanobactéries

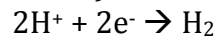
La bio-photolyse se réfère à l'action de la lumière sur un système biologique qui entraîne la dissociation d'un substrat (ici de l'eau) pour produire de l'hydrogène.

Certains micro-organismes sont capables de produire de l'hydrogène à partir de l'eau et l'énergie lumineuse, c'est le cas de certaines algues et cyanobactéries. C'est un processus en deux étapes :

- La photosynthèse oxygénique



- La production d'hydrogène par des enzymes « hydrogénases » (Ces enzymes seront décrites dans le chapitre suivant)



Il existe deux types de bio-photolyse dont les différences ne sont pas encore claires:

- soit par la présence ou non d'un décalage (spatial ou temporel) des deux étapes ;
- soit le passage des électrons directement de la ferrédoxine à l'hydrogénase ou par le passage des électrons par l'intermédiaire du NADP(H) (Ghirardi *et al.*, 2009 ; Ergolu and Melis, 2011) Les paragraphes suivants vous les présentent.

Bio-photolyse directe :

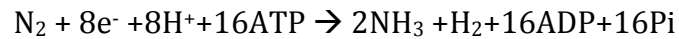
Le processus de bio-photolyse directe se fait chez certaines micro-algues vertes (ex : *Chlamydomonas reinhardtii*). La production d'hydrogène se fait au sein de leur chloroplaste dans lequel s'effectue la photosynthèse qui va générer des électrons qui vont réduire la ferrédoxine et transférer des électrons aux hydrogénases à centre Fe-Fe qui produisent de l'hydrogène. Mais ce processus produit de l'oxygène qui inhibe la production d'hydrogène au niveau de la transcription des gènes, de la stabilité de l'ARN et l'activité enzymatique. Ce qui entraîne une production transitoire d'hydrogène (quelques minutes après illumination).

Bio-photolyse indirecte :

Ce processus se fait principalement chez les cyanobactéries. Il existe deux types de cyanobactéries capables de produire de l'hydrogène par bio-photolyse indirecte :

- les cyanobactéries filamenteuses fixatrices d'azote (ex : *Nostoc*, *Anabaena*)

Lors d'une carence en azote, ces cyanobactéries vont former des cellules différenciées appelées hétérocystes afin de fixer l'azote grâce à leurs enzymes nitrogénases. Les nitrogénases étant sensibles à l'oxygène, les cyanobactéries vont créer des cellules spécialisées appelées « hétérocystes » dans lesquelles se crée un environnement micro-aérobie. La fixation de l'azote va également produire de l'hydrogène comme sous-produit selon l'équation suivante :



La nitrogénase est co-transcrite avec une enzyme appelée « uptake hydrogénase » qui consomme l'hydrogène pour récupérer de l'énergie, ce qui diminue le taux de production d'hydrogène. Des mutants de délétion de cette hydrogénase permettent d'augmenter la production d'hydrogène (Tamagnini *et al.*, 2007). Mais cette voie possède un rendement énergétique faible puisqu'elle nécessite un fort taux d'énergie (électrons de haute énergie + ATP), ce qui la rend peu rentable.

- les cyanobactéries non fixatrices d'azote (ex : *Synechocystis*, *Synechococcus*)

Comme chez les microalgues la production d'hydrogène se fait grâce aux électrons issus de la photosynthèse) mais la dernière étape est différente. En effet la ferrédoxine (Fed) réduit le NAD(P)⁺ en NAD(P)H dans le cytoplasme et le NAD(P)H transfère les électrons à l'hydrogénase qui produit de l'hydrogène. Mon projet de thèse se focalise sur cette voie de photoproduction d'H₂.

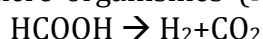
Le système hybride utilisant les bactéries photosynthétiques et anaérobies

Cette méthode combine la photosynthèse par des micro-organismes photosynthétiques et la fermentation par des bactéries non-photosynthétiques pour produire de l'hydrogène. Elle nécessite des micro-organismes photosynthétiques pour produire en présence de lumière (par la photosynthèse) des carbohydrates qui vont être digérés à l'obscurité par les bactéries non-photosynthétiques en anaérobies en acides gras et hydrogène (Pandu and Joseph, 2012).

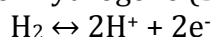
Chapitre II : Présentation des enzymes liées au métabolisme de l'hydrogène

HISTORIQUE

C'est en 1873 que Popoff décrit la formation de dioxyde carbone et d'hydrogène dans des boues anoxiques à partir du formate de calcium, puis en 1887 Hoppe -Seyler attribue ce clivage du formate à des micro-organismes (Hoppe-Seyler, 1887).



En 1931 Stephenson et Stickland découvrent une enzyme capable de réduire l'oxygène moléculaire, le fumarate, le nitrate ainsi que le bleu de méthylène en présence de dihydrogène dans plusieurs bactéries. Ils lui attribuent le nom d'« hydrogénase » responsable de l'oxydation réversible de l'hydrogène (Stephenson-Stickland, 1931).



En 1942, Gaffron et Rubin montrent la production d'hydrogène par des micro-algues (*Scenedesmus*) (Gaffron and Rubin, 1942) puis Gest et Kamen en 1949 dans les bactéries photosynthétiques (*Rhodospirillum rubrum*) (Gest and Kamen 1949). Ces résultats montraient la production de H_2 à partir de CO_2 et H_2O chez des micro-organismes. Depuis de nombreuses études sur le métabolisme d'hydrogène ont été menées et différentes enzymes ont été identifiées dans de nombreux micro-organismes (micro-algues, cyanobactérie, archées etc.).

Il existe deux familles d'enzymes liées au métabolisme d'hydrogène chez les micro-organismes: les nitrogénases et les hydrogénases. Ce chapitre décrit brièvement les nitrogénases puis se focalise sur les hydrogénases, objet de ma thèse.

NITROGENASE

La forme la plus abondante d'azote sur Terre est le N_2 , or pour assimiler l'azote les plantes ont besoin d'ammonium (NH_4^+) ou de nitrate (NO_3^-). Seules certaines bactéries (bactéries pourpres) et cyanobactéries (filamenteuses fixatrices d'azote) sont capables de fixer l'azote pour produire de l'ammoniac qui est une forme intermédiaire clé qui pourra être incorporée par les plantes.

La fixation d'azote chez les bactéries et les cyanobactéries est catalysée par une enzyme appelée « nitrogénase » qui réduit le diazote N_2 en deux molécules d'ammoniac NH_3 , cette réaction est accompagnée par la production d' H_2 (Meyer *et al.* 1978).

Les nitrogénases sont composées de deux parties: une sous-unité réductase et un complexe dinitrogénase (**Figure 3**). Il existe trois classes de nitrogénase, qui se différencient par la nature de leur site métallique situé dans la partie dinitrogénase et dont dépend la stœchiométrie de l'ammoniac et l'hydrogène produit (**Tableau 1**, Wall, 2004):

Mo-Nitrogénase	$N_2 + 8H^+ + 8e^- \rightarrow 2NH_3 + H_2$
Fe-Nitrogénase	$N_2 + 21H^+ + 21e^- \rightarrow 2NH_3 + 7.5H_2$
V-Nitrogénase	$N_2 + 12H^+ + 12e^- \rightarrow 2NH_3 + 3H_2$

Tableau 1 : Les équations bilan des différentes nitrogénases

Les Mo-nitrogénases sont les plus étudiées, elles contiennent :

- une sous-unité réductase : un homodimère de 64kDa avec un centre métallique [Fe-S], codé par *nifH*, donneurs d'électrons.
- une sous-unité dinitrogénase : un hétérotétramère de 230kDa codé par les gènes *nifD* et *nifK*, responsable de la réduction du N_2 .

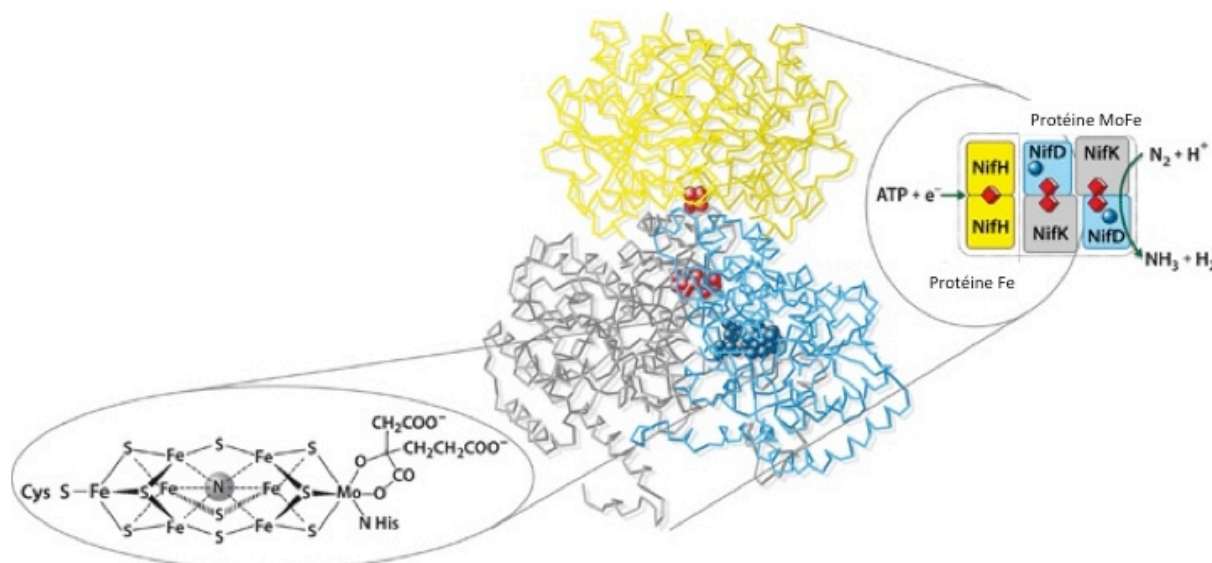


Figure 3 : Schéma d'une nitrogénase composée d'une protéine Fe et un complexe MoFe ainsi que sa structure tertiaire et la structure chimique du cofacteur MoFe (d'après Ghirardi *et al.*, 2008)

Le mécanisme réactionnel dans les nitrogénases se fait grâce une molécule d'ATP qui se lie à la sous-unité réductase qui entraîne l'hydrolyse de l'ATP puis un changement conformationnel et permet le transfert d'électron à la sous-unité dinitrogénase qui réduit le N_2 en NH_3 et H_2 . La réaction de fixation de l'azote se produit uniquement dans un environnement hypoxique car le complexe nitrogénase est sensible à l'oxygène qui l'inactive de manière irréversible, ce qui nécessite une séparation spatiale et la formation de cellules spécialisées. Un des inconvénients de ce système est que l' H_2 produit par les nitrogénases pour fournir de l'énergie aux cellules est consommé par une hydrogénase "uptake" (décrite dans le prochain chapitre) au sein des mêmes cellules. Cependant, la délétion de cette hydrogénase uptake améliore le rendement (Tamagnini *et al.*, 2007).

Par ailleurs, il a été montré que l'absence d'un substrat diazote permet une production exclusive d' H_2 . Mais la présence de N_2 (78% de l'atmosphère terrestre en composition volumétrique) abaisse le rendement. De plus la réaction requiert une grande quantité d'énergie fournie par l'ATP ce qui diminue l'efficacité énergétique, comparé aux hydrogénases à [NiFe] ou [FeFe] décrites dans le chapitre suivant.

HYDROGENASE

GENERALITES

Les hydrogénases qui ont été décrites pour la première fois par Stephenson et Stickland, sont des enzymes qui catalysent l'oxydation réversible de la molécule de dihydrogène (Stephenson-Stickland, 1931):



Ces enzymes sont appelées « hydrogénases réversibles ». Il existe cependant des enzymes qui consomment la molécule d' H_2 mais sont incapables de catalyser la production d'hydrogène : elles sont appelées les « hydrogénases uptake ».

Les hydrogénases se trouvent dans de nombreux micro-organismes issus de différents domaines du vivant, principalement chez les Bactéries et les Archées, mais on en retrouve également chez quelques Eucaryotes.

Les premières études ont classifié les hydrogénases selon une approche biochimique basée sur l'identification des accepteurs et donneurs spécifiques d'électrons : NAD, ferrédoxines, cytochromes, *etc.* A la fin des années 80, grâce à l'augmentation des séquences disponibles, une approche génétique permet de classer les hydrogénases phylogénétiquement. Dernièrement, le développement des techniques de cristallographie permet de découvrir les structures dimensionnelles des protéines et de retrouver les hydrogénases par leurs similitudes structurales. Mais il se peut que des similitudes de domaine existent entre des protéines ayant des activités catalytiques différentes, ce qui entraîne des conclusions erronées (Vignais *et al.*, 2007). Les analyses phylogénétiques ont permis d'identifier trois familles principales d'hydrogénases, basées sur la composition de leur site actif : Hydrogénase [Fe], Hydrogénase [Fe-Fe] et Hydrogénase [Ni-Fe] (incluant [NiFeSe]) (**Figure 4 et Figure 5**)

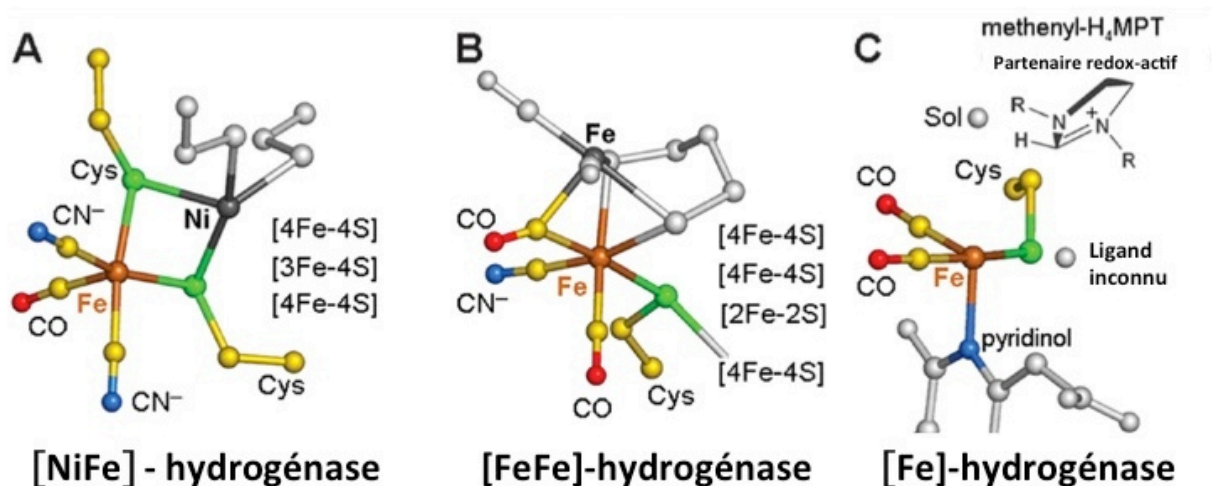


Figure 4 : Structure des sites actifs des trois familles d'hydrogénases :

(A) [NiFe] - hydrogénase de *Desulfovibrio gigas*

(B) [FeFe]-hydrogénase de *Clostridium pasteurianum*

(C) [Fe]-hydrogénase de *Methanocaldococcus jannaschii*

(D'après Shima *et al.*, 2008)

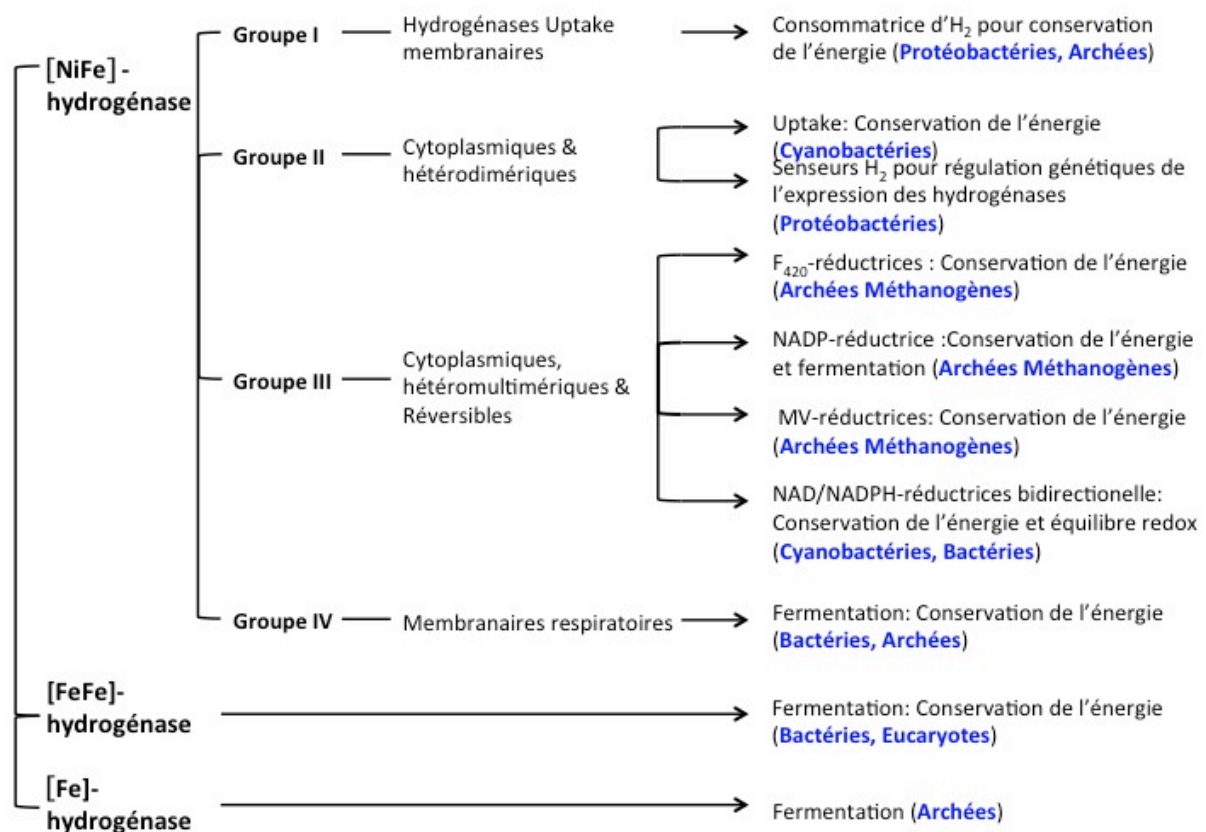


Figure 5 : Classification des hydrogénases (reproduit de (Kim *et al.*, 2011))

HYDROGENASE FE

Cette hydrogénase fut initialement nommée « hydrogénase sans centre [Fe-S] » ou « Hmd » (H₂-forming methenyltetrahydromethanopterin dehydrogenase). Elle ne possède qu'un seul atome de fer porté par un cofacteur organique : elle est donc référencée dans la littérature comme « [Fe]-only hydrogenase ». On la retrouve chez certaines archées méthanogènes qui utilisent le CO₂ et l'H₂ comme source d'énergie. L'hydrogénase Fe est composé d'un homo-dimère avec deux sous-unités de 38kDa portant un atome de fer (Wright *et al.*, 2010).

Elle possède des propriétés différentes des deux autres familles (Shima *et al.*, 2007) :

- l'atome de fer ne change pas d'état redox lors de la catalyse ;
- elle n'est pas redox active ;
- elle n'effectue pas les mêmes réactions biochimiques (elle ne produit pas d'H₂) ;
- elle catalyse une réaction intermédiaire de réduction du CO₂ en méthane en utilisant du H₂.

Cette hydrogénase n'est que brièvement décrite puisque que l'on possède peu d'informations dessus. De plus, elle se trouve éloignée phylogénétiquement des deux autres familles notamment de l'hydrogénase [NiFe] qui nous intéresse.

HYDROGENASE Fe-Fe

Les hydrogénases à centre [FeFe] codées par le gène *hydA* se trouvent principalement chez des procaryotes anaérobies comme les bactéries sulfato-réductrices (*Desulfovibrio desulfuricans*), des clostridies (*Clostridium pasteurianum*) ainsi que chez certaines micro-algues (*Chlamydomonas reinhardtii*). C'est la seule catégorie d'hydrogénase présente chez les Eucaryotes (elles sont principalement localisées dans des organelles tels que les chloroplastes ou les hydrogénosomes).

Structure et site actif

Les hydrogénases à [FeFe] possèdent des structures très hétérogènes avec une grande variété de tailles (de 45 kDa à plus de 130 kDa). Elles sont généralement monomériques cependant il existe des hydrogénases dimériques, trimériques, et tétramériques.

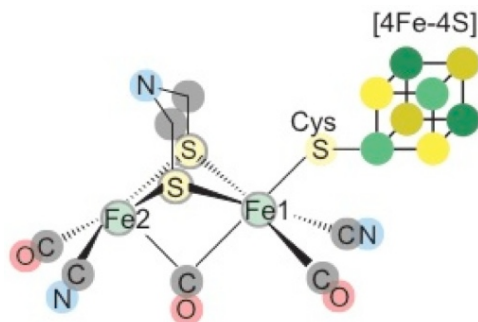


Figure 6 : cluster H d'une hydrogénase FeFe

La plupart des hydrogénases [FeFe] caractérisées partagent une structure commune avec plusieurs clusters [Fe-S] liés au domaine catalytique appelé « cluster H ». Dans ce cluster H très conservé dans toutes les hydrogénases [FeFe], on retrouve le site actif qui est coordonné par des ligands non protéiques, CN⁻ et CO et 1 cystéine qui est elle-même liée à un cluster [Fe-S] (Figure 6).

Les structures cristallographiques des hydrogénases [FeFe] ont été déterminées chez la bactérie anaérobie *Clostridium pasteurianum* (CpI) (Peters *et al.*, 1998) et chez la bactérie sulfate-réductrice *D. desulfuricans* (DdH) (Nicolet *et al.*, 1999 ;

Figure 7)

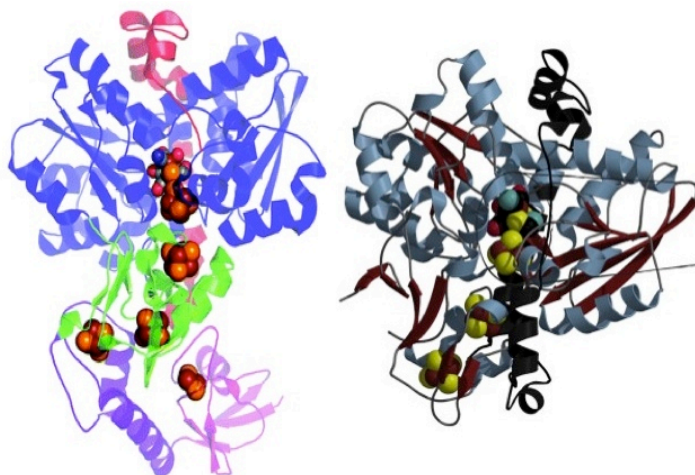


Figure 7 : Structure des hydrogénases FeFe

(A) *Clostridium pasteurianum* d'après McGlynn S. E. *et al.*, 2009

(B) *D. desulfuricans* d'après Nicolet *et al.*, 2010

Les hydrogénases de plus petite taille sont constituées presque uniquement d'un cluster H : c'est le cas de l'hydrogénase de *Chlamydomonas reinhardtii*, qui est la plus petite hydrogénase mise en évidence à ce jour. Les hydrogénases de plus grande taille comportent des domaines dits « accessoires » comprenant des centres [Fe-S]. Ces domaines N-terminaux sont très hétérogènes, on y retrouve des similarités avec les ferrédoxines 2[4Fe-4S] bactériennes ou des oxydoréductases ou bien encore des « thioredoxine-like » qui assurent le transfert des électrons et permettent l'organisation de la structure de l'hydrogénase.

Caractéristiques

Ces hydrogénases sont caractérisées par une sensibilité très importante à l'oxygène et une activité catalytique de production d'hydrogène très élevée (Adams *et al.*, 1990, Vignais *et al.*, 2001, Horner *et al.*, 2002) . Leur site actif présente plusieurs états (actif ou inactif) en fonction du potentiel et des molécules qui s'y lient. Elles sont plutôt productrices d'hydrogène, cependant il a été montré que l'hydrogénase périplasmique [FeFe] de *D. vulgaris* possède une fonction 'uptake'.

Partenaires physiologiques

Les hydrogénases [FeFe] possèdent plusieurs types de partenaires physiologiques : les cytochromes c solubles (chez les bactéries), les ferrédoxines (bactéries et micro-algues) et les flavodoxines (lors de carence en fer chez les bactéries).

L'interaction avec les partenaires n'est pas encore bien comprise ; il a été suggéré qu'elle serait due à des interactions électrostatiques ou à la complémentarité structurale des sites.

Maturation et assemblage

La maturation des hydrogénases [FeFe] est un processus encore peu connu, cependant certaines étapes de cette maturation ont été mises en évidence. **(Figure 8)**

Afin d'être active, l'hydrogénase codée par le gène *hydA* doit incorporer le cluster H et si besoin les domaines accessoires. Le mécanisme d'insertion du site actif fait intervenir trois maturases: HydE, HydF et HydG, (Posewitz MC *et al.*, 2004).

HydE et HydG appartiennent aux enzymes « Radical-SAM » impliquées dans la synthèse de ligands et HydF possède un domaine GTPase agissant comme une protéine d'échafaudage dans laquelle le centre [FeFe] est assemblé avant d'être transféré à l'hydrogénase.

Selon le schéma hypothétique de maturation, HydE synthétise un ligand dithiolate sur un cluster [2Fe-2S] porté par HydF. Ensuite HydG utilise une molécule de tyrosine pour synthétiser les ligands CO et CN, ce qui complète la synthèse du cluster H. Pour finir la protéine HydF qui sert de plateforme, transfère le cluster H à une protéine HydA non maturée qui contient un cluster [4Fe-4S]. L'incorporation du site actif va permettre l'activation de l'enzyme. (Sybirna *et al.*, 2013)

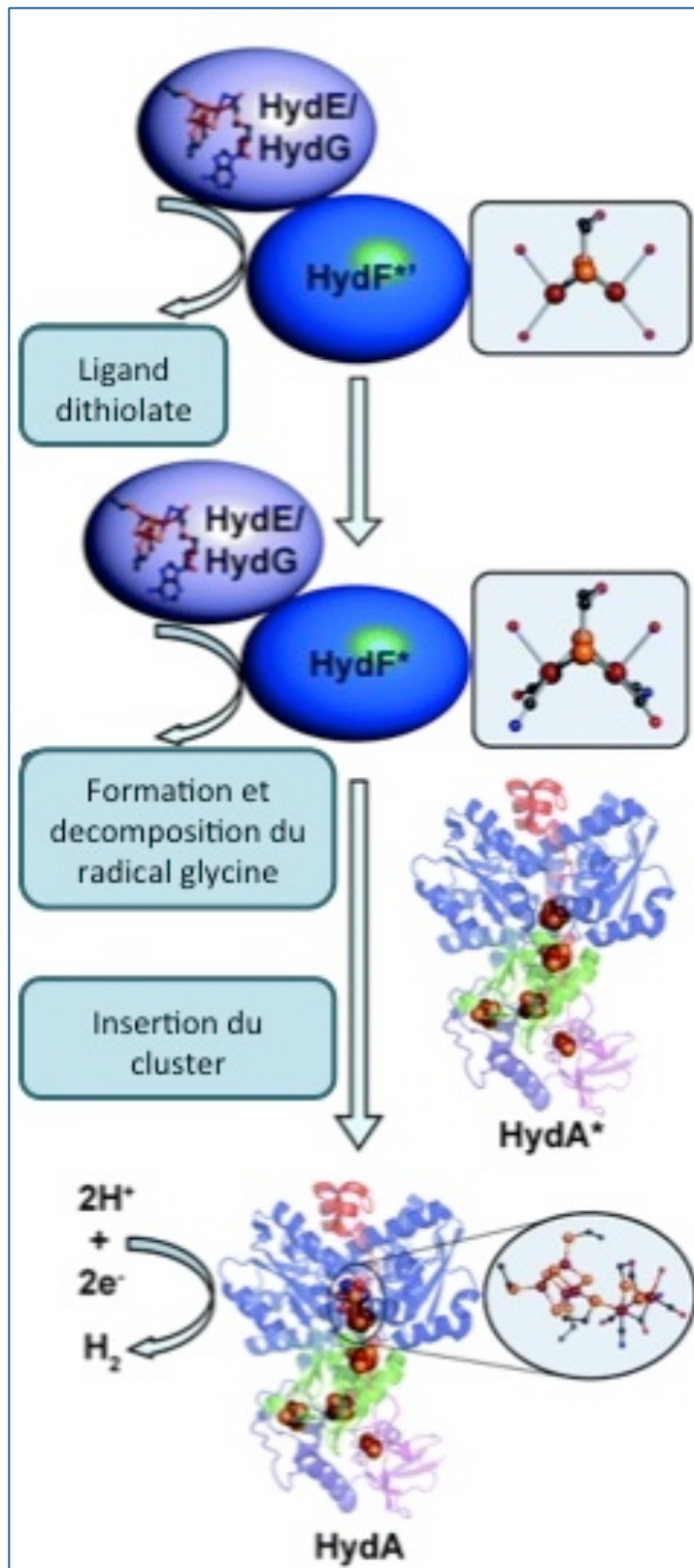


Figure 9 : Processus de maturation et d'assemblage de l'hydrogénase FeFe (Reproduit de McGlynn S. E. *et al.*, 2009)

HYDROGENASE Ni-Fe (INCLUANT NiFeSe)

Le grand groupe des hydrogénases à centre actif bimétallique [NiFe] est le plus étudié et le mieux caractérisé à ce jour. On retrouve ces hydrogénases Ni-Fe chez les cyanobactéries, les protéobactéries et les archées méthanogènes. Elles peuvent être cytoplasmiques, périplasmiques et membranaires (Vignais *et al.*, 2010).

Certaines hydrogénases [NiFe], possédant un atome de sélénium dans leur site actif appartiennent au sous-groupe des hydrogénases [NiFeSe]. On les retrouve chez les bactéries sulfato-réductrices (Wright *et al.*, 2010).

Structure et Site actif

La structure cristallographique de l'hydrogénase de *Desulfovibrio gigas* fut la première structure d'hydrogénase à centre [NiFe] publié (Volbeda *et al.*, 1995). Par la suite d'autres structures d'hydrogénase [NiFe] ont été déterminées ce qui permet de constater une grande similarité de structure entre ces différentes hydrogénases (**Figure 10**).

Elles sont toutes constituées de deux sous-unités :

- une grande sous-unité d'environ 60 kDa composée principalement d'hélices α qui porte le site catalytique bimétallique [NiFe] ;
- une petite sous-unité d'environ 30 kDa composée de feuillets β qui possède jusqu'à 3 clusters [Fe-S] permettant le transfert d'électron.

Les deux sous-unités disposent d'une large surface de contact et forment un hétérodimère globulaire.

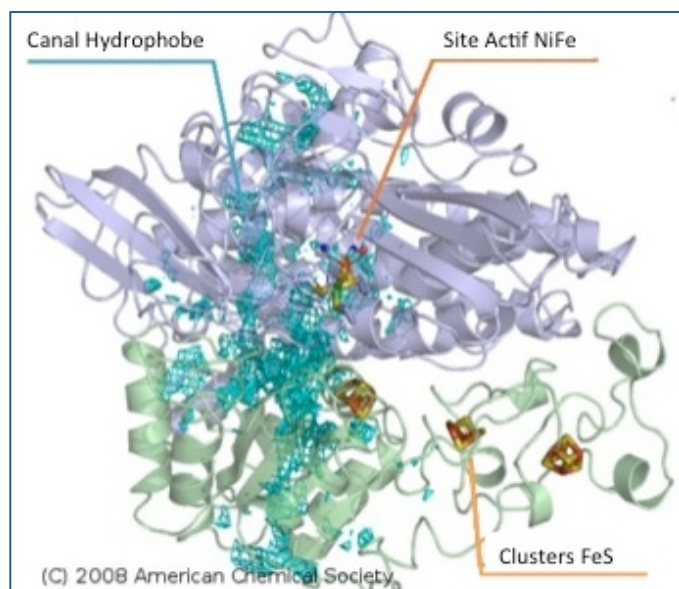


Figure 10 : Structure de l'hydrogénase *Desulfovibrio fructosovorans*

(D'après C. Cavazza, 2008)

La petite sous-unité possède trois clusters cubiques [Fe-S] de type [4Fe-4S] qui conduisent les électrons jusqu'à la grande sous-unité. Les molécules gazeuses passent par un canal hydrophobe du site actif jusqu'à la surface de l'enzyme au niveau de la grande sous-unité. L'alignement des séquences de la grande sous-unité et de la petite sous-unité montre que les deux sous-unités ont évolué conjointement.

Le site actif est composé d'un atome de nickel apparié à quatre cystéines, dont deux sont reliées à l'atome de fer apparié à des ligands non-protéiques CO et CN⁻ (parfois SO). Le site actif des hydrogénases [NiFeSe] possède un atome de sélénium à la place d'une cystéine terminale (**Figure 11**).

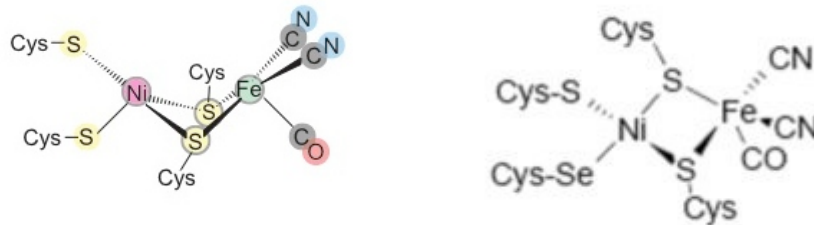


Figure 11 : Site actif des hydrogénases NiFe et NiFeSe

Classification, caractéristiques et partenaires physiologiques

Ces hydrogénases sont caractérisées par leur inactivation réversible par l'O₂. Par comparaison de séquence de la grande sous-unité, il a été montré que deux régions proches des cystéines du site actif [NiFe] sont fortement conservées, elles sont appelées L1 et L2. Ces deux séquences ont permis de classer les hydrogénases en 4 groupes principaux (Vignais *et al.*, 2001) (**Figure 12**).

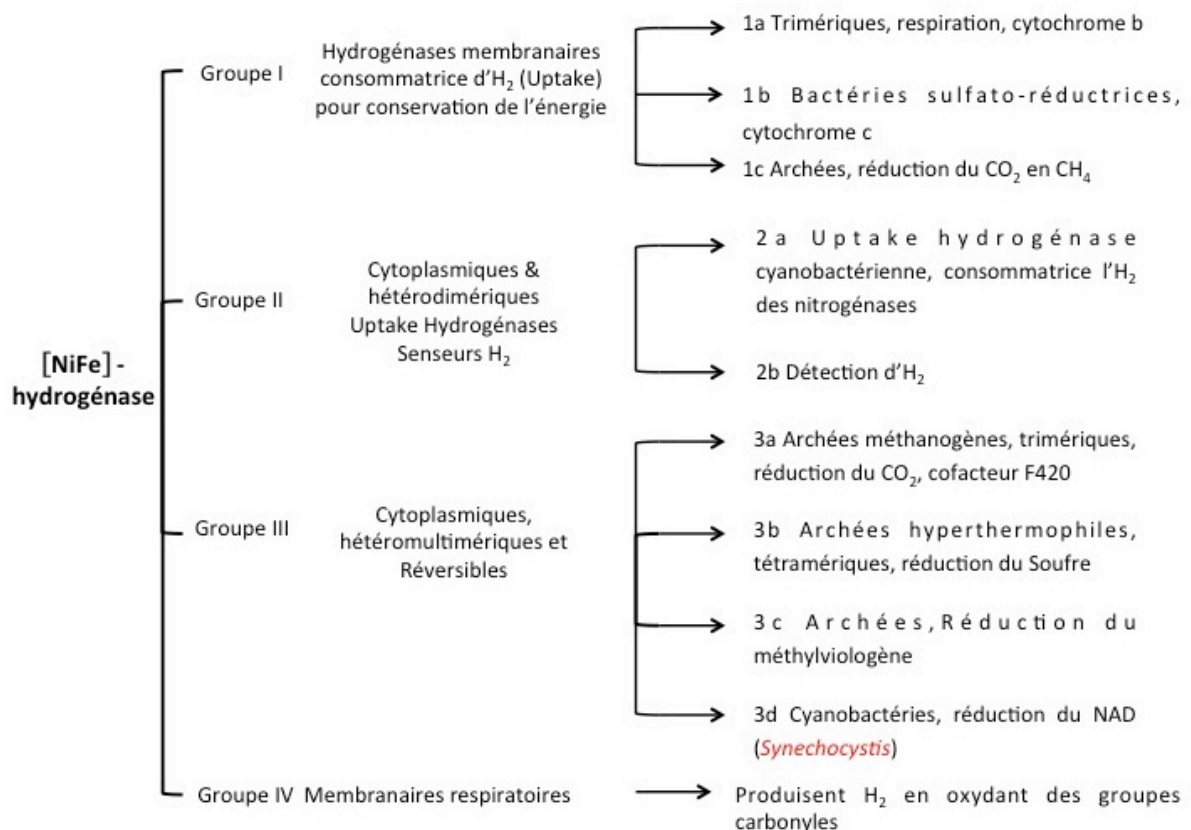


Figure 12 : Classification des hydrogénases

Groupe I : Hydrogénases 'Uptake' à NiFe

Ce sont des hydrogénases membranaires qui consomment de l' H_2 pendant la respiration.

Cette réaction est couplée à la réduction d'accepteur d'électrons comme le sulfate, nitrate, fumarate, CO_2 (respiration anaérobie) ou O_2 (respiration aérobie) ce qui crée un gradient de protons transmembranaire qui va générer de l'énergie. Ces hydrogénases souvent appelées Hup permettent aux organismes qui les possèdent de croître avec de l' H_2 comme source d'énergie. Elles sont principalement étudiées chez les protéobactéries, cependant on en trouve aussi chez les archées.

Chez certaines protéobactéries (*Ralstonia eutropha*), les hydrogénases sont connectées au pool de quinone de la chaîne respiratoire membranaire par la partie C-terminale de la petite sous-unité. La troisième sous-unité est composée d'un cytochrome b qui lie l'hydrogénase à la membrane et permet de coupler le flux d'électrons issu de l'oxydation de l' H_2 au pool de quinone pour créer un gradient de proton et de l'énergie. Chez les bactéries sulfato-réductrices (*Desulfovibrio*), le transfert d'électrons se fait vers des cytochromes c. Tandis que chez les archées le flux d'électrons issu de l'oxydation de l' H_2 va être transféré à un cytochrome b qui va entraîner par une chaîne de réaction la réduction du CO_2 en CH_4 . Du côté N-terminal de la petite sous-unité, les hydrogénases uptake sont caractérisées par la présence d'un peptide signal (30-50 acides aminés) qui permet leur translocation vers la membrane.

Groupe II : Hydrogénase Uptake à NiFe cyanobactérienne et Hydrogénase senseurs d' H_2

Les hydrogénases du groupe II sont cytoplasmiques et souvent hétérodimériques. Elles se subdivisent en deux catégories :

Groupe II-a : Les hydrogénases uptake cyanobactériennes cytoplasmiques catalysent l'oxydation de l'hydrogène produit par la nitrogénase. On les retrouve chez les cyanobactéries unicellulaires filamenteuses fixatrices d'azote. Leur expression est induite lors des conditions dans lesquelles la cyanobactérie fixe l'azote.

Les hydrogénases du groupe IIa consomment l' H_2 pour récupérer de l'énergie comme celles de groupe I. Cependant elles sont phylogénétiquement différentes car des séquences (domaine) sont absentes dans la grande sous-unité. Ceci est vrai aussi pour les hydrogénases du groupe IIb.

Groupe II-b : Les hydrogénases senseurs d' H_2 (H_2 -sensing) sont localisées dans le cytoplasme. Elles ont pour rôle de détecter la présence d' H_2 afin de réguler l'expression des hydrogénases [NiFe] respiratoires (Kleihues *et al.*, 2000). Elles sont présentes chez certaines protéobactéries (*Bradyrhizobium japonicum*). Les hydrogénases sensing possèdent une région C-terminale conservée (environ 50 acides aminés) qui leur permet de s'apparier à une histidine kinase. L'hydrogénase va oxyder l' H_2 puis transférer les électrons à l'histidine kinase qui s'associe à un régulateur, ce qui modifie sa phosphorylation et active l'expression des hydrogénases. Contrairement à la majorité des hydrogénases, il s'agit d'hydrogénases O_2 tolérantes. Cette tolérance n'est pas bien comprise, mais il a été démontré que le canal hydrophobe qui permet le passage des gaz est plus restreint, ce qui empêche l'accès de l' O_2 au site catalytique (Duché *et al.*, 2005 et Buhrke *et al.*, 2005). Malheureusement ces hydrogénases tolérantes à l' O_2 possèdent une activité très faible.

Groupe III : Hydrogénase bidirectionnelle hétéromultimériques cytoplasmiques

Les hydrogénases du groupes III sont cytoplasmiques ou situées du coté cytoplasmique de la membrane, elles sont capables d'oxyder et de produire de l'hydrogène dans certaines conditions physiologiques. De plus elles possèdent une sous-unité qui réagit avec un cofacteur soluble (coenzyme F₄₂₀, NAD/NADP...). Elles sont réparties dans 4 sous-groupes selon le cofacteur utilisé :

Groupe III-a : Ce groupe comporte des hydrogénases trimériques issues d'archées méthanogènes qui sont des organismes strictement anaérobies. Certaines archées méthanogènes ne possèdent pas de cytochromes, elles réduisent le CO₂ en CH₄ en utilisant le cofacteur F₄₂₀ (8-hydroxy-5-déazaflavine). Les hydrogénases de ces archées méthanogènes possèdent une sous-unité qui réduit le cofacteur F₄₂₀, afin de réduire le CO₂ en CH₄, ce qui permet leur croissance. Une partie des archées méthanogènes possèdent des hydrogénases qui ne réduisent pas le cofacteur F₄₂₀ (Vignais *et al.*, 2007).

Groupe III-b : Dans ce groupe on retrouve des hydrogénases tétramériques des archées hyper-thermophiles capables de croître à des températures de plus de 80°C. Elles ont été découvertes chez *Pyrococcus furiosus*, puis appelées « sulfhydrogénases » car elles étaient capables d'évacuer l'excès d'électrons généré pendant la fermentation en utilisant des polysulfures ou des protons. D'autres hydrogénases de cette classe ont été identifiées, qui sont caractérisées par leur capacité à utiliser le soufre pour la production de H₂S (Vignais *et al.*, 2007).

Groupe III-c : Ces hydrogénases sont très peu connues, leur fonction n'est caractérisée que par leur capacité à réduire le méthylviologène.

Groupe III-d : Cette classe regroupe les hydrogénases bidirectionnelles solubles capables d'utiliser le NAD comme substrat, on les retrouve chez les protéobactéries et chez les cyanobactéries. Elles ont été isolées pour la première fois chez une protéobactérie (*Ralstonia eutropha*, Schneider *et al.*, 1976), plus tard elles ont été identifiées chez les cyanobactéries pour la première fois chez *Anabaena variabilis* (Schmitz *et al.*, 1995). L'hydrogénase de *Synechocystis* ne fut décrite qu'en 1996 (Appel et Schultz, 1996).

Elles sont composées de deux parties qui peuvent fonctionner de manière indépendante:

- la partie hydrogénase qui contient le site [NiFe]
- la partie diaphorase qui contient des clusters [Fe-S] pour le transfert d'électrons.

Selon les études et auteurs on les retrouve faiblement liées aux membranes chez *Synechocystis* ou aux thylakoïdes chez *Anabaena variabilis* et certaines se retrouvent dans la fraction membranaire. Plusieurs rôles ont été proposés, le plus plausible étant qu'elles permettraient d'évacuer les excès d'électrons en formant du H₂ pour éviter un stress oxydant (cette partie sera approfondie dans le chapitre suivant).

Groupe IV : Hydrogénase NiFe respiratoire membranaire génératrice d'H₂

Dans ce groupe, on retrouve les hydrogénases respiratoires à centre [NiFe], il s'agit d'hydrogénases membranaires capables de coupler l'oxydation d'un groupement carbonyle (formate, acetate, CO₂) avec la réduction de protons en H₂. Cette réaction crée un gradient de protons qui va permettre de récupérer de l'énergie par la force motrice

des protons à travers la membrane. Elles furent découvertes en 1997 chez *E. coli* (Andrews *et al.*, 1995) dont l'acronyme était *E. coli* H₂ase 3-type (Ech), (actuellement l'acronyme représente Energy-converting hydrogénases). Elles sont caractérisées par une petite sous-unité de très petite taille par rapport aux autres hydrogénases. Elles possèdent de plus une forte homologie avec la sous-unité transmembranaire impliquée dans le pompage de proton du complexe I de la respiration.

Origine des hydrogénases eucaryotes

Les séquences nucléiques et polypeptidiques des hydrogénases à centres [FeFe] et [NiFe] sont très différentes et ne sont pas reliées phylogénétiquement. Cependant des travaux de cristallographie au rayon X au niveau de leur site catalytique montrent d'étonnantes ressemblances dans leur configuration, ce qui est décrit comme un cas d'évolution convergente.

Par ailleurs on peut noter que la majorité des hydrogénases chez les Bactéries et Archées sont de type [NiFe] et quelques [FeFe], tandis que seules les [FeFe]-hydrogénases sont présentes chez les Eucaryotes (micro-algues vertes).

L'origine des hydrogénases [FeFe] chez les eucaryotes est sujette à de nombreuses spéculations. Il a été proposé que l'origine des chloroplastes dans les micro-algues vertes provienne de l'endosymbiose de cyanobactéries avec une cellule eucaryote primitive (voir chapitre suivant). Cependant actuellement aucune cyanobactérie ne possède les gènes qui codent pour le métabolisme d'hydrogène des micro-algues vertes. Mais on les retrouve dans des bactéries anaérobies (*Clostridium*), ce qui suggère un transfert latéral des gènes entre les bactéries anaérobies et les micro-algues.

Assemblage des hydrogénases NiFe

La maturation de la grande sous-unité des hydrogénases [NiFe] dépend d'au moins 7 protéines qui interviennent dans la synthèse des ligands CO et CN et l'incorporation du cofacteur [Ni-Fe] de l'enzyme et l'activation de la grande sous-unité.

Les premiers gènes de maturation ont été identifiés par un criblage de mutagénèse aléatoire chez *E. coli*. Six gènes nommés *hyp* (« genes affecting hydrogénase pleiotropically »): *hypABCDEF* qui se trouvent souvent en opéron, avec l'exception de *Synechocystis* sp. PCC 6803 dont les gènes *hyp* sont éparpillés dans le génome. Les protéines Hyp possèdent des motifs conservés entre les organismes. De ce fait, la nomenclature des gènes *hyp* est conservée pour l'ensemble des organismes présentant des homologies sauf pour *Azotobacter chroococcum* (*hupABYCDE*).

Une protéase codée par le gène *hoxW* est également essentielle à la maturation de la grande sous-unité. Cette protéase clive la partie C-terminale de la grande sous-unité pour lui permettre d'être active.

Le processus de maturation de la grande sous-unité (**Figure 13**) est brièvement décrit ci-dessous :

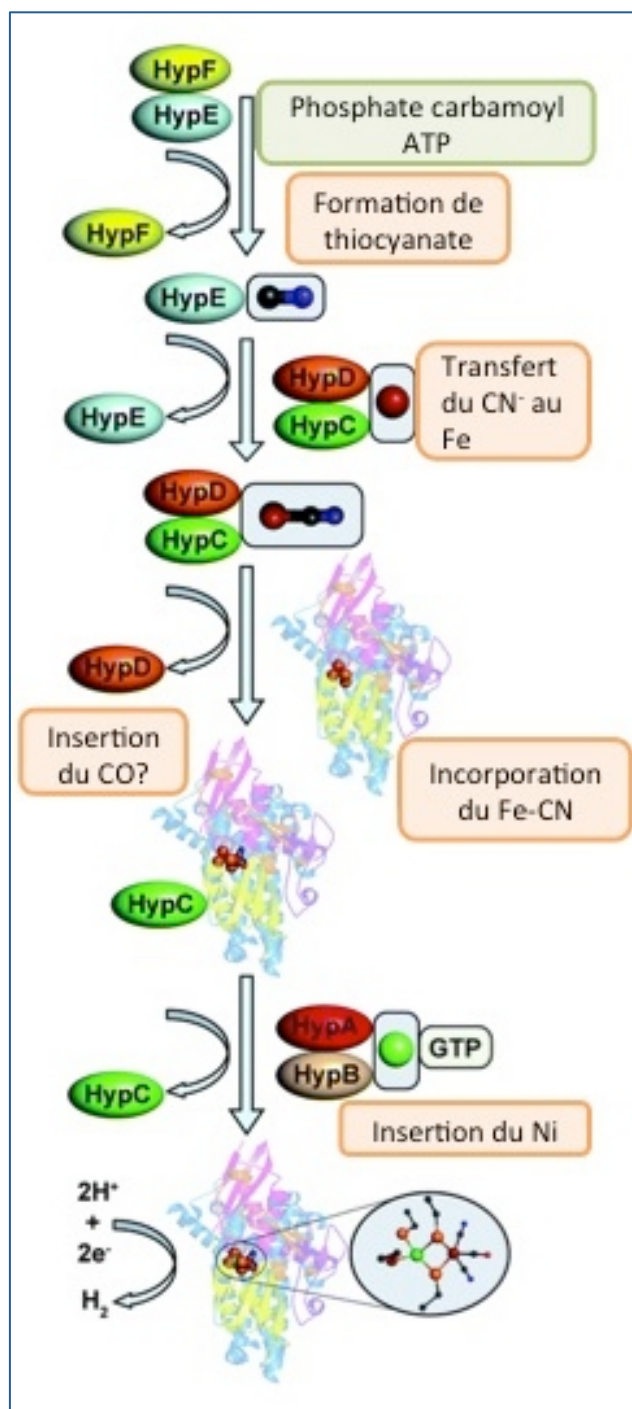


Figure 13 : Processus de maturation et d'assemblage de l'hydrogénase NiFe (Reproduit de McGlynn S. E. *et al.*, 2009)

L'assemblage de la petite sous-unité n'est pas encore entièrement compris mais il semblerait qu'au moins 4 protéines accessoires soient nécessaires à sa maturation (Manyani *et al.*, 2005).

La description de l'assemblage chez *Synechocystis* est plus approfondie au chapitre suivant.

Lors de l'incorporation du cofacteur Ni-Fe, le fer s'incorpore en premier, sous l'action des protéines HypE et HypF qui interviennent dans la synthèse des ligands CN et CO. Pour générer le ligand CN, HypE et HypF utilisent le phosphate carbamoyl (CP) comme substrat et après hydrolyse d'ATP, forment du thiocyanate lié à HypE. Le groupe CN porté par HypE est ensuite transféré au fer, lié au complexe HypD/HypC, puis le groupe Fe-CN est incorporé dans la grande sous-unité de l'hydrogénase.

La deuxième phase consiste en l'incorporation du Nickel dans le centre Ni-Fe, qui requiert HypA1 et HypB1, et une source inconnue de CO. HypA1 est une protéine à Zinc qui agit comme une chaperonne Ni, HypB est une GTPase qui contrôle le transfert du nickel à HypA1 ou la libération de la chaperonne sans Ni.

Enfin, le peptide C-terminal de l'hydrogénase de la sous-unité HoxH est clivé par une endopeptidase, ce qui complète le processus de maturation de la grande sous-unité. Le processus de maturation de la petite sous-unité se fait parallèlement, mais indépendamment. On suppose que les gènes *hyp* agissent dans l'orientation des centres [Fe-S] lors de leur incorporation, par un processus encore mal connu.

Régulation des hydrogénases NiFe

L'hydrogénase étant liée au métabolisme énergétique de la cellule, plusieurs facteurs environnementaux peuvent induire des changements transcriptionnels. Voici quelques exemples: Lors d'une carence en azote, il existe une cascade de régulation qui contrôle la transcription des gènes codant l'hydrogénase uptake. Elle fait intervenir l'hydrogénase senseur, une histidine kinase et un régulateur (voir hydrogénase [NiFe] du groupe II). L'oxygène peut induire des changements transcriptionnels par exemple chez *E. coli*, on observe un système qui contrôle la transcription en absence d'O₂ (Iuchi and Lin, 1993).

L'ajout de nickel induirait la transcription du gène *hupL* codant l'hydrogénase uptake et la transcription du gène *hoxH* codant l'hydrogénase bidirectionnelle chez *Nostoc* PCC 73102 et *N. muscorum* (Axelsson and Lindblad, 2002).

Les cycles circadiens sembleraient aussi influencer l'expression des hydrogénases chez *Synechococcus* PCC7942 (Schmitz *et al.*, 2001).

Activation des hydrogénases NiFe

Le site actif des hydrogénases [NiFe] peut adopter plusieurs états, dont leur dénomination reste complexe. De plus, différents noms dans la littérature peuvent désigner le même état.

En présence d'O₂ le site actif [NiFe] est inactivé réversiblement et rapidement réactivable par le pouvoir réducteur du NAD(P)H (Cournac *et al.*, 2004).

Les hydrogénases adoptent plusieurs états en raison de leur sensibilité à l'O₂, en effet après exposition à l'oxygène deux états oxydés du site actif sont possibles en fonction des conditions présentes au moment de l'inactivation par l'O₂ (**Figure 14**).

- Dans des conditions très oxydantes (pas d'H₂ et haut potentiel redox du milieu), il n'y a pas assez d'électrons pour réduire complètement l'O₂ qui par conséquent se réduit partiellement en ligand peroxyde OOH-, il y a alors formation de l'état Ni-A (Unready) qui est rapidement réactivé quand les conditions seront réductrices (quelques minutes) ;
- Dans des conditions réductrices (présence d'H₂ et bas potentiel redox du milieu), il y a assez d'électrons pour réduire complètement l'O₂ en ligand hydroxyde OH- et il y a formation de l'état Ni-B (Ready) qui se réactive très lentement en conditions réductrices (plusieurs heures).

Mais des récentes études montrent que la formation des deux espèces inactives est indépendante de la présence de l'O₂ (Hamdan *et al.*, 2012), ce qui remet en question le mécanisme ci-dessus et ouvre le débat sur la nature du ligand oxygénique dans NiA.

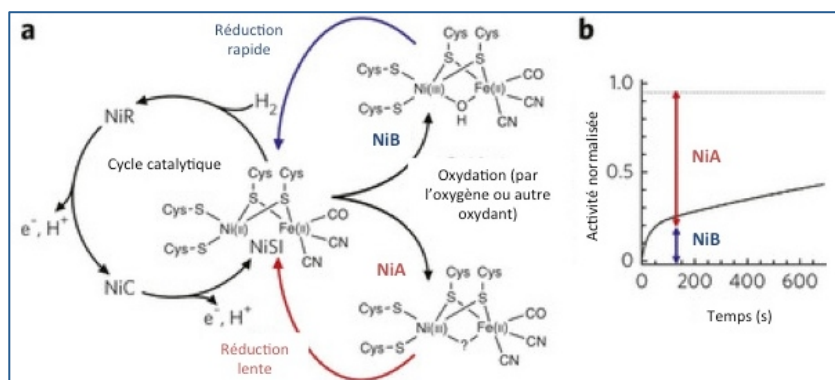


Figure 14 : Forme active et inactive de l'hydrogénase NiFe et graphique de réactivation par PFV (Reproduit de Abou Hamdan *et al.*, 2012)

Chapitre III : Propriété de la cyanobactérie modèle *Synechocystis* PCC6803 et la Photosynthèse

PRESENTATION DES CYANOBACTERIES

ORIGINES

La vie sur Terre est apparue sous des conditions réductrices (gaz carbonique, méthane ect.) vers -3,5 à -3 milliards d'années (Diestrich *et al.*, 2006). Pendant longtemps la biosphère était majoritairement composée de bactéries anaérobies. L'atmosphère devint oxydante avec le développement d'organismes photosynthétiques. Il a été démontré que les ancêtres des cyanobactéries sont apparus entre 2,5 et 3 milliards d'années et ont rapidement proliféré (Brocks *et al.*, 1999), ils auraient joué un rôle clé dans la formation d'une atmosphère oxygénique par l'utilisation de la photosynthèse.

La photosynthèse (décrite ultérieurement) permettait aux cyanobactéries de convertir l'énergie lumineuse et l'eau pour générer de l'énergie (ATP) et du pouvoir réducteur (NAD(P)H) nécessaire à l'assimilation des nutriments inorganiques (C, N, S *etc.*). Elle dégage également de l'oxygène qui est un « déchet » pour les organismes photosynthétiques, mais cette accumulation d'oxygène dans l'atmosphère a permis le développement d'organismes aérobies qui utilisent l'oxygène comme un fort accepteur d'électrons. Les premières micro-algues sont apparues il y a 2 milliards d'années et ont transformé une grande partie du gaz carbonique en oxygène. Ce processus encore existant permet d'obtenir notre atmosphère actuelle qui contient environ 21% d'O₂.

Un autre facteur de l'origine d'une atmosphère oxygénique : Les volcans

Les cyanobactéries ne seraient pas les seules responsables de l'oxygénation de notre planète, en effet par des études thermodynamiques il a été suggéré :



- Un changement de l'état d'oxydo-réduction des gaz volcaniques à 2,5 milliards d'années mais cette hypothèse est débattue car les magmas, sources de ces gaz, n'ont pas changé depuis 3,5 milliards d'années ;
 - Il y a 2,7 milliards d'années la Terre connut la formation de grandes masses continentales et par conséquent le volcanisme aérien avec un important rejet de soufre, qui entraîna la réduction du sulfate des océans en sulfure de fer permettant de fixer le fer ferreux qui empêchait l'oxygène produit par les cyanobactéries d'envahir l'atmosphère (Gaillard *et al.*, 2011).
-

A savoir :

Les cyanobactéries possèdent un système photosynthétique similaire à celui des plantes et sont considérées comme les ancêtres des chloroplastes chez les plantes (**Figure 15** ; Archibald *et al.*, 2009). Au début du 20^e siècle, K. Mereschowsky a émis l'hypothèse que les chloroplastes pouvaient provenir d'une symbiose entre une cyanobactérie et une cellule eucaryote. Ces idées furent ignorées jusqu'à ce que l'on confirme son hypothèse par comparaison de séquences génétique, moléculaire et de structure. Cette symbiose serait survenue il y a environ 1,5 milliards d'années.

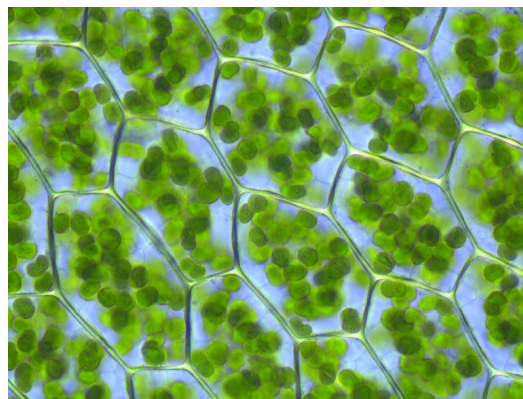


Figure 15 : Chloroplaste de *Plagiomnium affine* d'après K. Peters

DIVERSITE

Ecologique

Actuellement, les cyanobactéries sont l'un des plus variés et des plus importants groupes de bactéries. Ce sont des organismes importants pour notre planète, en effet par leur système photosynthétique, elles continuent à maintenir avec les plantes un équilibre entre le gaz carbonique et l'oxygène. De plus, elles ont un rôle fondamental dans la fixation du CO₂ (gaz à effet de serre) atmosphérique puisqu'elles assurent 30 à 40% de la production d'O₂ et de consommation du CO₂ par les océans (Partensky *et al.*, 1999). Certaines participent également à la fixation d'azote atmosphérique dans les forêts tropicales, mangroves et dans les océans (**Figure 16**).

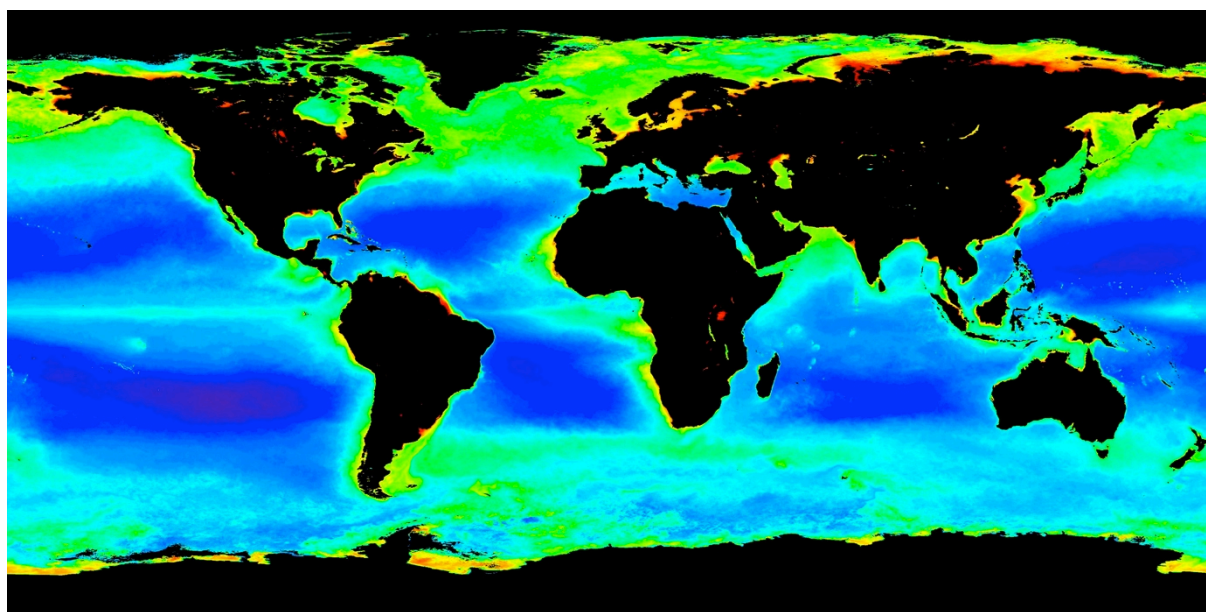


Figure 16 : Cartographie de la concentration en chlorophylle *a* (cyanobactéries et algues) dans les eaux de surface de l'océan (satellital SeaWiFS)

Les cyanobactéries appartiennent au phytoplancton et sont les principaux producteurs de biomasse de la chaîne alimentaire, elles représentent ainsi la première barrière biologique à l'entrée des toxiques. Mais certaines cyanobactéries synthétisent des toxines (cyanotoxines) qui peuvent être un danger pour l'homme (Méjean *et al.*, 2013 -livre).

Les cyanobactéries sont l'un des groupes les plus importants écologiquement, actuellement on les retrouve dans presque tous les écosystèmes et biotopes terrestres : eaux (douces, saumâtres et marines, à diverses températures : 1-70°C et pH 6,5-12), et les sols (déserts chauds ou polaires...). Elles peuvent également vivre en symbiose avec d'autres organismes dans des biofilms ou avec des plantes supérieures pour leur permettre de fixer l'azote par leur racine (**Figure 17**).

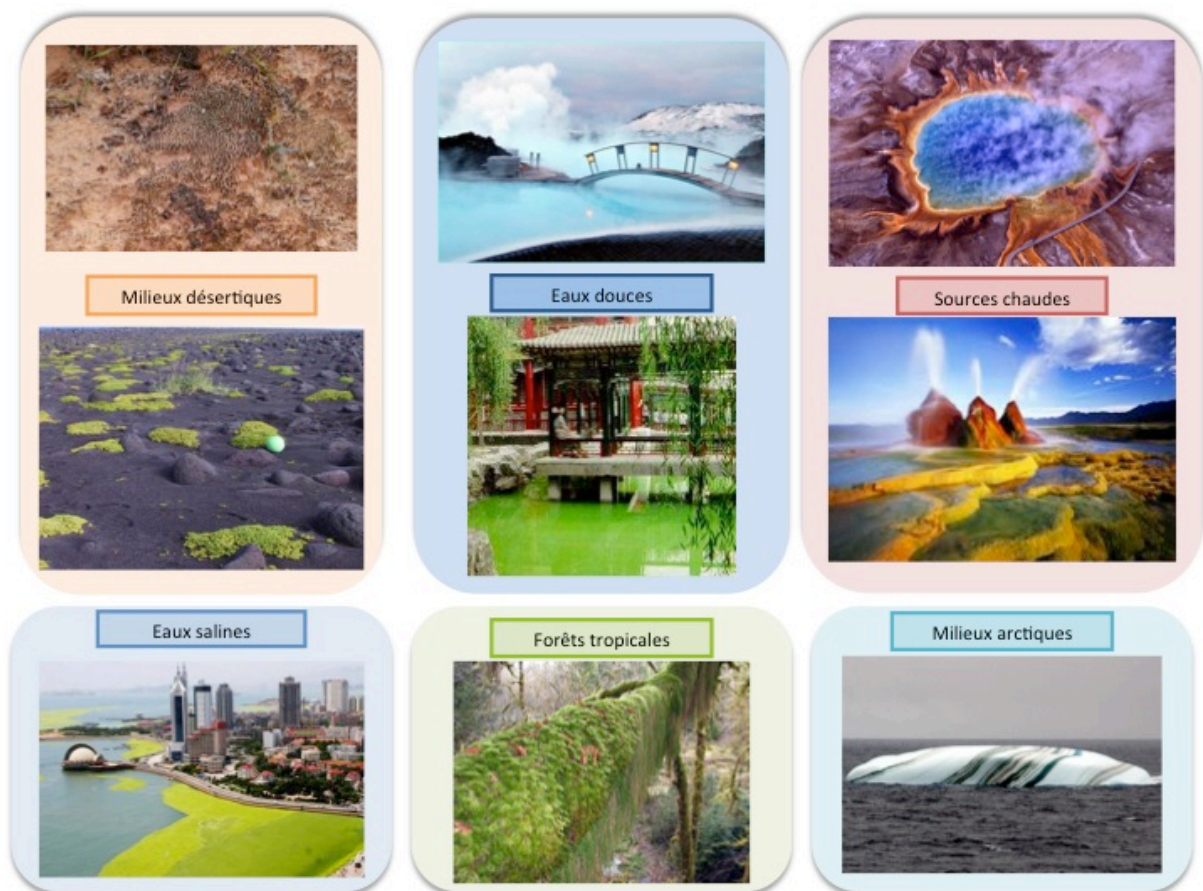


Figure 17 : Diversité des écosystèmes des cyanobactéries

Leur faculté à coloniser différents milieux leur ont permis d'acquérir des métabolismes adaptés aux différentes conditions de leur environnement comme par exemple : la tolérance à des températures extrêmes, des taux de salinité élevés, la résistance à certains métaux ...

Morphologie et physiologie

Il existe plus de 1500 espèces de cyanobactéries qui présentent une très grande diversité morphologique et métabolique (**Figure 18**).

Il existe des cyanobactéries :

- Unicellulaires : sphériques (ex : *Synechocystis* sp. PCC6803) ou en bâtonnets (*Thermosynechococcus elongatus*)
- Pluricellulaires : filamenteuses linéaires (ex : *Spirulina platensis*) et filamenteuses linéaires avec des cellules différenciées (ex : *Anabaena variabilis*) ou ramifiées (ex : *Fischerella*)

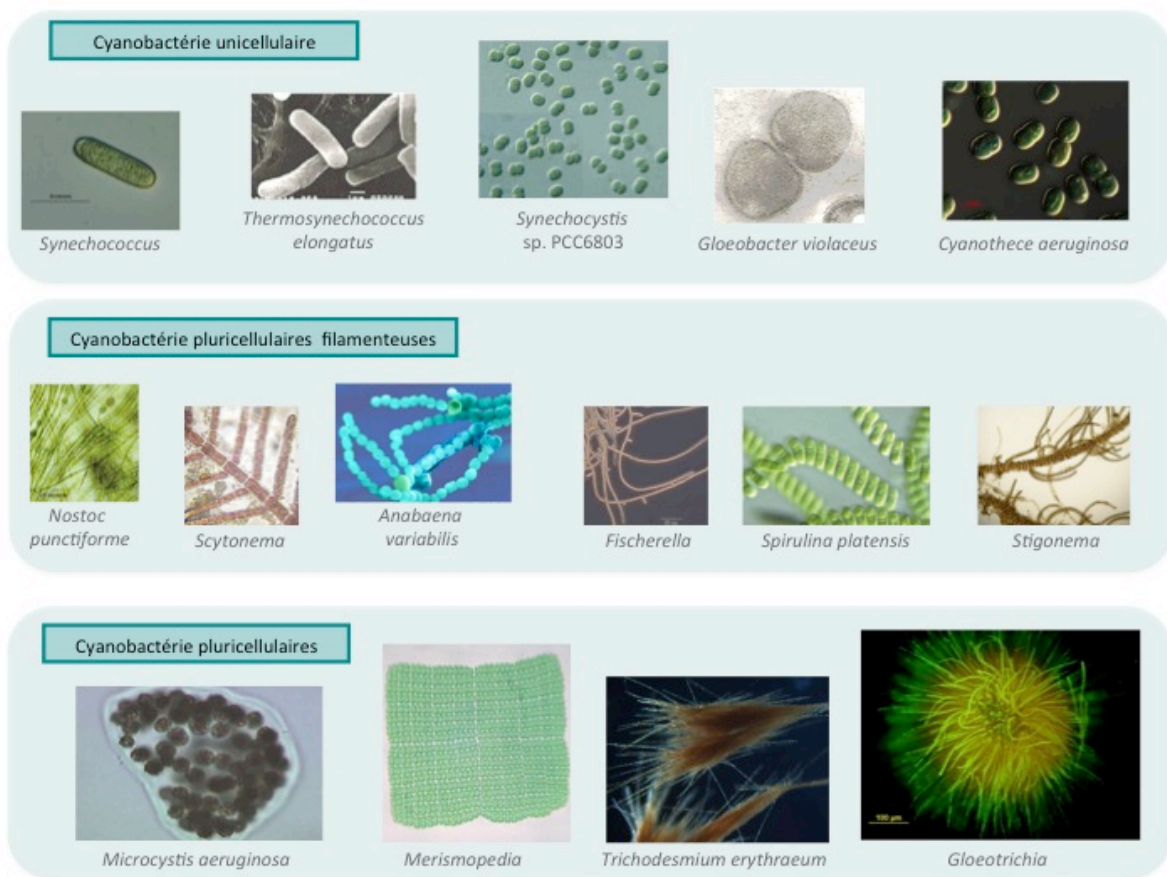
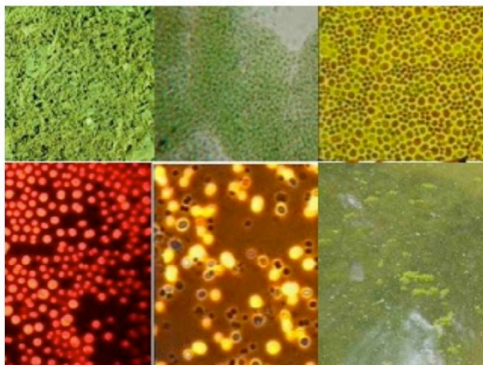


Figure 18 : Diversité morphologique des cyanobactéries

Certaines sont capables de différencier des cellules spécialisées (hormogonies, hétérocystes, akinètes) en réponse aux changements environnementaux.

Leur taille varie beaucoup selon les espèces, les espèces unicellulaires mesurent entre 0,6 μm et 10 μm tandis que les espèces filamenteuses peuvent former des filaments qui mesurent jusqu'à 1 mètre de long.



Ce groupe était anciennement appelé « algues bleues » car un grand nombre synthétise un pigment appelé phycocyanobiline qui à forte concentration donne une couleur bleu-vert. Elles peuvent également synthétiser d'autres pigments qui leur donnent des couleurs : dorées, brunes, orangées, pourpres... (Figure 19)

Figure 19 : Couleur des pigments des cyanobactéries

CARACTERISTIQUES

Les cyanobactéries sont des micro-organismes procaryotes à Gram négatif capables de faire la photosynthèse. Elles possèdent des caractéristiques similaires à celles des algues (synthèse de chlorophylle a et caroténoïdes) et aux procaryotes (présence d'une paroi cellulaire, absence de noyau, de plaste et de mitochondrie). Selon la classification systématique, elles ont appartenu longtemps au règne végétal, mais elles appartiennent en réalité au domaine des Bactéries (Garrit *et al.*, 2001). Elles se distinguent des autres bactéries photosynthétiques (bactéries pourpres ou vertes) par l'utilisation de la molécule d'eau comme donneur d'électrons.

Toutes les cyanobactéries sont autotrophes, certaines sont également hétérotrophes facultatives (ex : *Synechocystis* sp PCC6803 peut croître sur un milieu supplémenté en glucose ; Rippka *et al.*, 1979).

Elles possèdent deux photosystèmes complexes (PSI et PSII) avec des structures protéiques qui captent la lumière, constituées de phycobiliprotéines (PSII) et chlorophylle (PSI), situées à l'extérieur de la membrane des thylakoïdes.

Leurs réserves azotées sont constituées de phycocyanine (polypeptide d'arginine et asparagine) et leurs réserves carbonées sont sous forme de glycogène et de gouttelettes lipidiques.

La taille des génomes cyanobactériens varie entre 1,27 Mb chez *Prochlorococcus marinus* MI 9301 et 12,01 Mb chez *Scytonema hofmanni* (ncbi - génome ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/>)

Par comparaison des habitats, il semblerait que les cyanobactéries marines ont tendance à avoir un petit génome à faible ploïdie (1 à 2 copies du chromosome), tandis que les cyanobactéries confrontées à des environnements changeants possèdent un plus grand génome avec plusieurs copies car elles nécessitent plus de flexibilité et de gène pour permettre leur adaptation. Cependant il existe des exceptions telle que la cyanobactérie marine *Acaryochloris marina* MBIC1101 qui possède un génome de 8,4Mb.

Par ailleurs, on a pu constater que les génomes cyanobactériens possèdent un taux de nucléotide G et C qui varie entre 32 à 71% en fonction de leur habitat. En effet dans un milieu chaud le taux de G-C est plus élevé puisqu'une liaison G-C est plus stable qu'une liaison A-T.

CLASSIFICATION

Générale

Dans le classement actuel du vivant effectué sur l'étude d'une trentaine de gènes orthologues existants dans 191 espèces au génome séquencé, les cyanobactéries se trouvent dans le domaine des Bactéries, proches des hyperthermophiles et des Deinococques. (**Figure 20**)

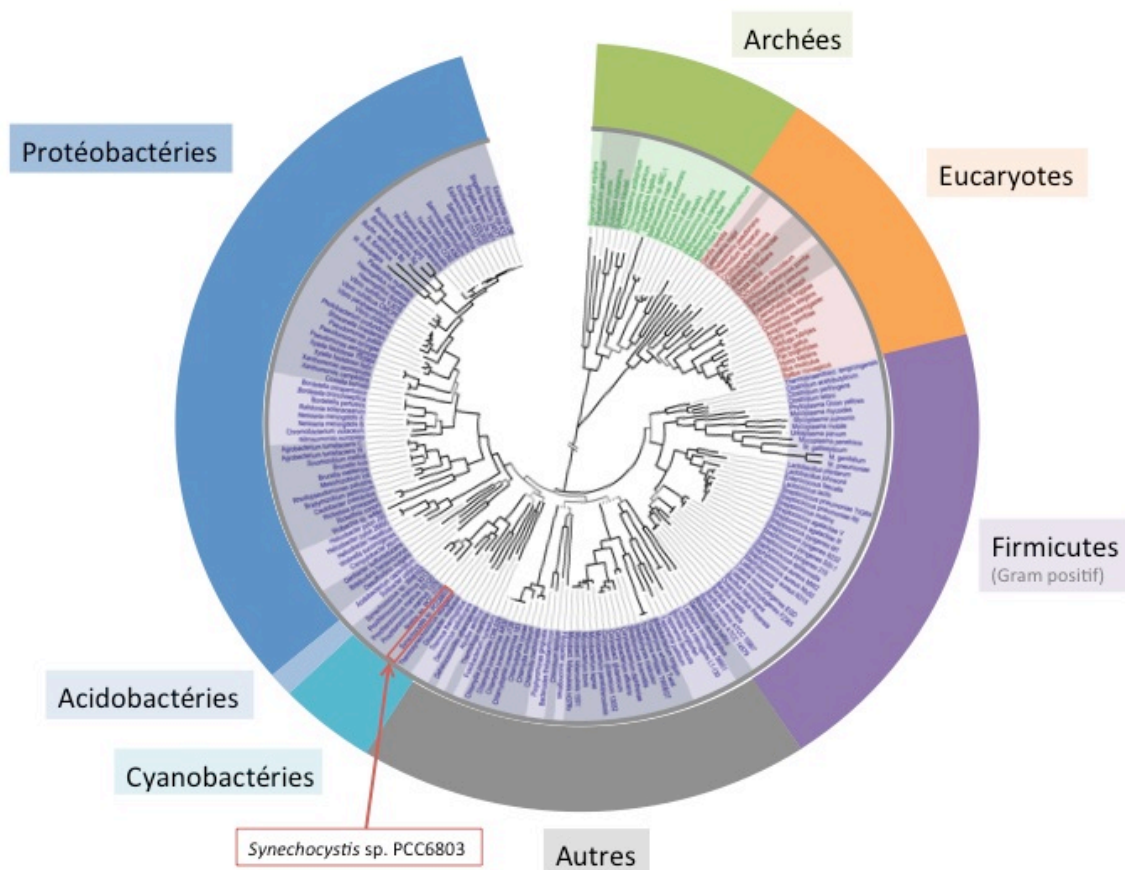


Figure 20 : L'arbre phylogénétique de la vie (d'après Ciccarelli *et al.*, 2006)

Des cyanobactéries

La classification des cyanobactéries dépend d'une classification bactériologique et d'une classification botanique (McNeill *et al.*, 2006), je ne m'intéresserai qu'à la première.

La première classification taxonomique des cyanobactéries proposait une division en 6 groupes principaux (Stanier and Bazire, 1977). Cette classification ne permettait pas de classer certaines cyanobactéries et en 1979 Rippka proposa une autre taxonomie légèrement différente (Rippka *et al.*, 1979) qui comportait 5 sections (Tableau 2):

I	Cyanobactéries unicellulaires qui se multiplient par fission binaire et bourgeonnement
II	Cyanobactéries unicellulaires qui se multiplient par fission multiples
III	Cyanobactéries filamenteuses sans hétérocystes qui se divisent sur un seul plan
IV	Cyanobactéries filamenteuses avec hétérocystes qui se divisent sur un seul plan
V	Cyanobactéries filamenteuses sans hétérocystes qui se divisent sur plusieurs plans

Tableau 2 : Classification des cyanobactéries selon Rippka *et al.*, 1979

Des travaux récents de bioinformatique ont permis d'émettre des hypothèses sur l'évolution des génomes cyanobactériens. Ils ont mis en évidence deux branches principales d'évolution des génomes à partir de 58 génomes de cyanobactéries (**Figure 21**):

- Les souches ayant appris à s'adapter à des environnements plus variés et qui ont acquis plus de caractères spécifiques et des génomes plus grands ;
- Les souches comprenant des cyanobactéries unicellulaires plus simples qui ont réduit leur génome au minimum.

Actuellement plus de 70 génomes entiers cyanobactériens ont été séquencés et sont disponibles et des centaines de projets de séquençage de génomes cyanobactériens sont en cours (Shih *et al.*, 2013). *Synechocystis* sp. PCC6803 fut le premier organisme photo-autotrophe avec un génome entièrement séquencé (Kaneko *et al.*, 1996).

Des travaux récents ont permis de commencer à classer les cyanobactéries phylogénétiquement par la séquence de leur ARN 16s qui est largement conservée. Mais à cause du faible nombre de génomes séquencés cette méthode est encore limitée.

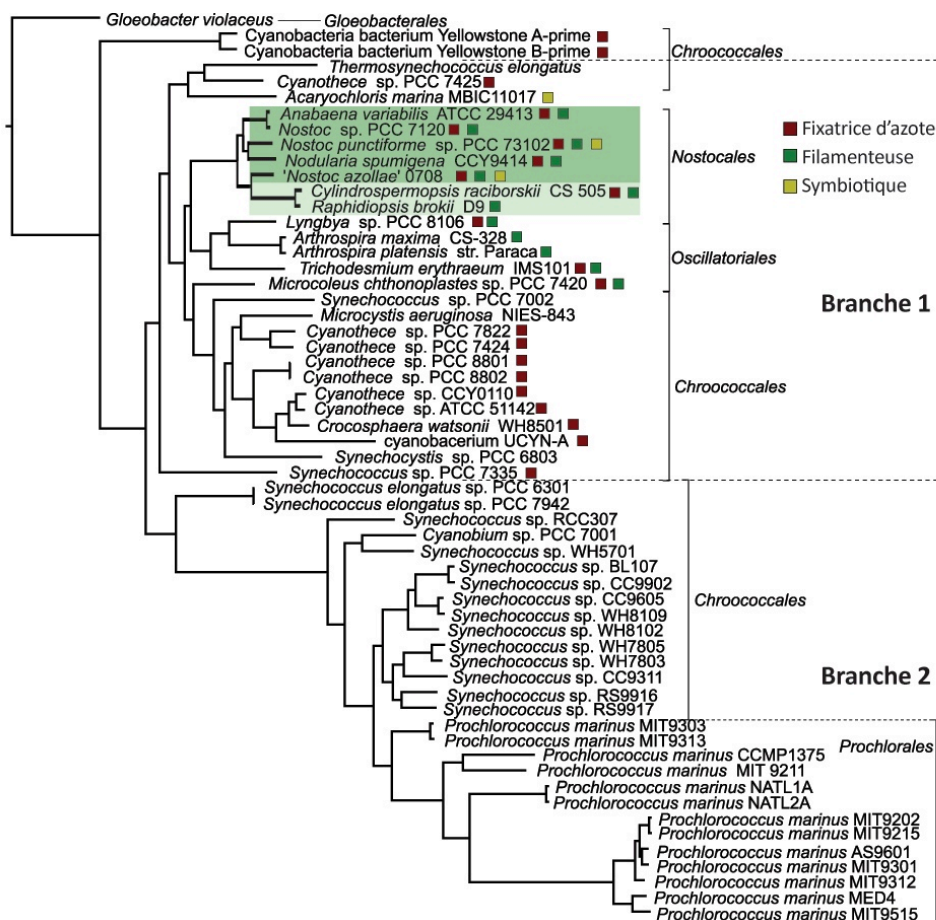


Figure 21 : Phylogénie de 58 cyanobactéries (d'après Larsson *et al.*, 2011)

POTENTIEL BIOTECHNOLOGIQUE

Du temps des Aztèques au Mexique la cyanobactérie *Spirulina* était récoltée dans les lagunes de Mexico puis mélangée au maïs pour faire des galettes séchées, très riches en protéines et qui sont devenues une nourriture très populaire. De nos jours certains peuples d'Afrique et d'Asie continuent à récolter et à consommer cette cyanobactérie. Par leurs qualités nutritives, elles font partie de la fabrication de nombreux

compléments alimentaires et pourraient constituer la nourriture du futur. Par ailleurs, elles sont également utilisées dans la cosmétologie et pour la production de colorants naturels (**Figure 22**).

Du point de vue biotechnologique les cyanobactéries présentent un potentiel très important (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2002), elles peuvent être utilisées pour:

- La production de molécules thérapeutiques : anticancéreuses, anti-oxydantes et antivirales (Nunnery *et al.*, 2010; Russo *et al.*, 2012; Dixit *et al.*, 2013)
- Production de bio-énergies : bio-diésel, bio-hydrogène (Ducat *et al.*, 2011; McKinlay *et al.*, 2010; Rosgaard *et al.*, 2012)
- Production de bio-plastiques (Abed *et al.*, 2009 ; Chee *et al.*, 2010)

Au niveau environnemental elles sont utilisées à des fins de bio-dépollution, en raison de leur habilité à séquestrer le CO₂ (Yang *et al.*, 2001) et de leurs mécanismes de défense cellulaire contre certains métaux.

Un important avantage de l'utilisation des cyanobactéries à des fins biotechnologiques, c'est que celles-ci ne nécessitent pas d'utiliser les terres arables contrairement à l'agriculture. De plus, elles présentent des avantages expérimentaux par rapport aux plantes supérieures :

- elles poussent facilement et rapidement en milieux solide ou liquide ;
- les acides nucléiques et protéines sont facilement isolables ;
- facile a manipuler pour faire des études génétiques

Malgré la grande diversité des cyanobactéries, seul un nombre restreint de souches sont utilisées pour des études physiologiques et génétiques, dont *Synechocystis* sp. PCC 6803 qui est le modèle d'étude de cette thèse et qui est présenté dans le prochain paragraphe.



Figure 22 : Intérêt biotechnologique et alimentaire des cyanobactéries

SYNECHOCYSTIS PCC6083

Synechocystis sp. PCC6803 (que nous appellerons *Synechocystis* dans la suite du manuscrit) est la cyanobactérie modèle sur laquelle repose mon projet de thèse.



Figure 23 : *Synechocystis* sp. PCC 6803

Synechocystis est un des modèles cyanobactériens les plus utilisés mondialement. Elle fut isolée d'un lac d'eau douce nord américain en 1968 proche de l'université de Berkeley (Stanier *et al.*, 1971) et fut déposée dans la collection pasteur (PCC) la même année. Elle fut le premier modèle d'étude de la photosynthèse et reste à ce jour la cyanobactérie la mieux caractérisée (**Figure 23**).

CARACTERISTIQUES ET PHYSIOLOGIE

Dans les années 80, Shestakov et ses collaborateurs ont montré que *Synechocystis* est naturellement transformable par recombinaison homologe avec un ADN étranger qui permet de remplacer une région génique par une autre, c'est une de ses caractéristiques majeures.

Une autre caractéristique physiologique de *Synechocystis* est sa capacité à pousser en hétérotrophie en présence de glucose, ce qui permet de caractériser les composants de l'appareil photosynthétique par l'analyse de mutants non essentiels sur un milieu enrichi en glucose.

Synechocystis est une cyanobactérie unicellulaire, non toxique qui fait partie des Chroococcales. Elle peut tolérer différentes salinités (euryhaline) dont des milieux saumâtres (Richardson *et al.*, 1983) et des pH très alcalins.

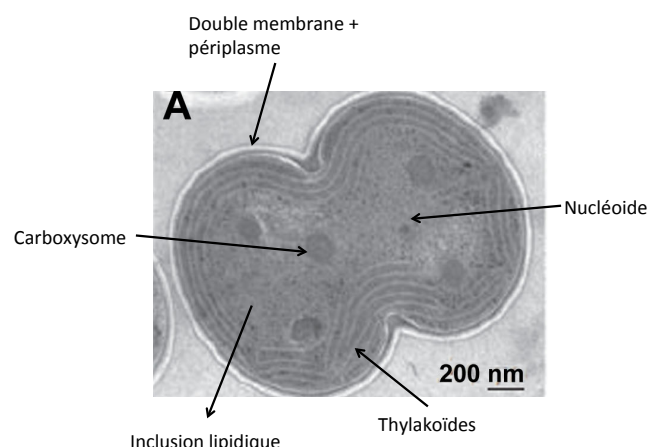


Figure 24 : Coupe de cellule *Synechocystis* en microscopie électronique (d'après Kerfeld *et al.*, 2005)

Elle possède un diamètre d'environ 1 μm , entourée d'une membrane et d'un périplasme. Elle ne possède aucun organite (mitochondrie ou chloroplaste) mais possède des thylakoïdes dans son cytoplasme où se déroule la photosynthèse. La respiration a lieu dans la membrane interne de la paroi cellulaire et dans les thylakoïdes. Elle ne possède pas de noyau et par conséquent son ADN se trouve dans le cytoplasme (**Figure 24**).

Elle est capable de respirer en réduisant l'oxygène grâce à une voie similaire aux mitochondries, mais elle n'est pas capable d'effectuer la fixation de l'azote.

C'est une cyanobactérie motile (phototactisme positif) qui se déplace afin de bénéficier d'un éclairage optimal. De plus elle synthétise des exopolysaccharides qui lui permettent de se relier entre elles et de s'organiser en biofilm (Jittawuttipoka *et al.*, 2013 ; Pereira *et al.*, 2009).

GENETIQUE

Ce micro-organisme est particulièrement intéressant sur le plan génétique par son habilité à être transformé naturellement, ce qui permet de déléter efficacement tous ses gènes de manière totale si le gène n'est pas indispensable, ou de manière partielle dans le cas contraire (Grigorieva and Shestakov, 1982; Labarre *et al.*, 1989).

Synechocystis partage de nombreux gènes avec les plantes (environ 600 gènes dont 160 de fonction inconnue), son génome fut le premier génome cyanobactérien séquencé. Il possède un chromosome de 3.57 Mb et trois petits plasmides de 5.2, 2.4 et 2.3 Kb ainsi que quatre grands plasmides de 120, 106, 103 et 44 Kb (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase/Synechocystis>; Figure 25). Chaque cellule possède une dizaine de copies du chromosome (polyploïde).



Figure 25 : Chromosomes et plasmides de *Synechocystis*

CULTURE

Synechocystis se développe sur un milieu minéral sans ajout de complément (voir matériels et méthodes) à une température optimum de 25°C à 30°C mais elle peut également supporter des températures allant jusqu'à 39°C sur plusieurs jours (Rippka *et al.*, 1979). Elle peut également pousser à des pH très alcalins, ce qui peut limiter la contamination microbienne des cultures (Summerfield and Sherman, 2008).

INTERET BIOTECHNOLOGIQUE

Synechocystis produit naturellement des bioplastiques (polyhydroxybutyrates ou PHB; Tsang *et al.*, 2013), des molécules d'intérêt (molécules antioxydantes, anticancéreuses *etc.*; Costa *et al.*, 2012) et de l'hydrogène grâce à une enzyme appelée hydrogénase qui est l'objet de cette thèse.

PHOTOSYNTHESE

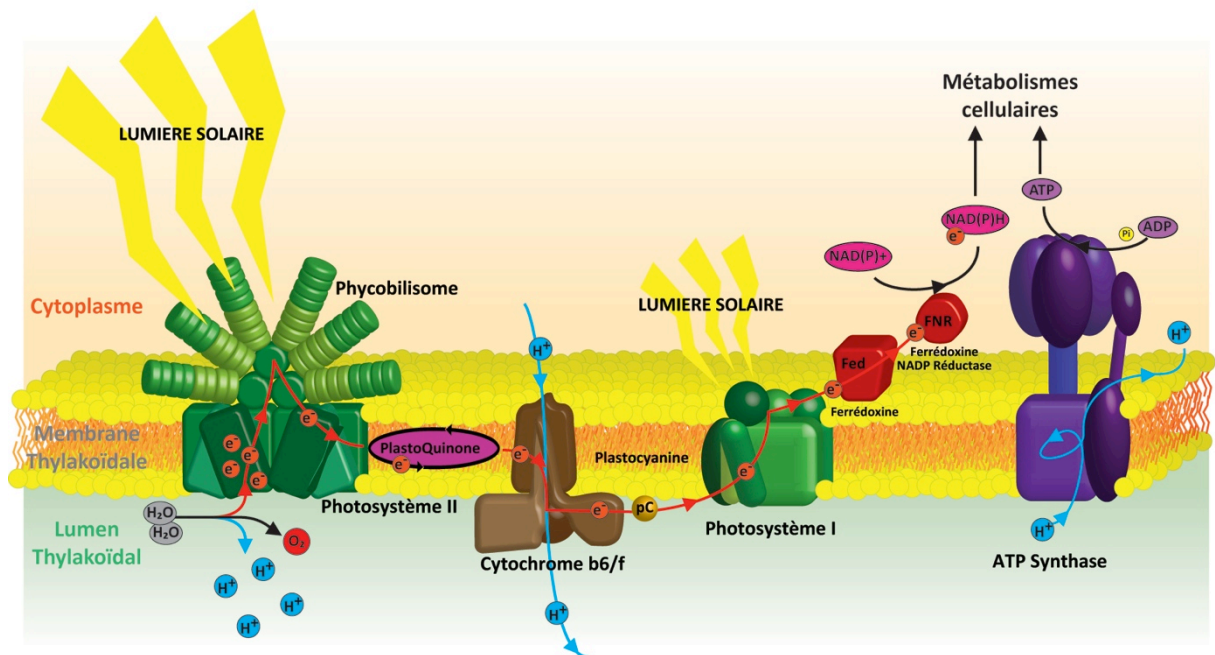
GENERALITE

La photosynthèse est le mécanisme biologique le plus ancien et le plus important de conversion d'énergie solaire en énergie chimique nécessaire à tout l'écosystème de la planète.

Il existe deux types de photosynthèse en fonction du donneur final d'électrons : si le donneur final est une molécule d'eau, on parle de photosynthèse oxygénique car il y a production d'oxygène ; si le donneur final n'est pas une molécule d'eau, on parle de photosynthèse non oxygénique. Dans les paragraphes qui suivent, nous nous intéresserons à la photosynthèse oxygénique.

PHOTOSYNTHESE CHEZ LES CYANOBACTERIES

Les cyanobactéries comme *Synechocystis* présentent de très grandes similitudes au niveau de son appareil photosynthétique avec les chloroplastes (les chloroplastes proviennent d'un ancêtre des cyanobactéries, voir plus haut). Par sa mixotrophie, la délétion des gènes du système photosynthétiques n'est pas létale pour *Synechocystis* contrairement aux plantes supérieures, ce qui a permis l'étude approfondie des photosystèmes.



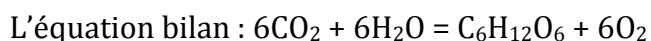
La chaîne de Transfert d'électrons et la photophosphorylation autour du processus de photosynthèse chez les cyanobactéries

Figure 26 : Chaîne de transfert d'électrons et la photophosphorylation autour du processus de photosynthèse chez les cyanobactéries

L'appareil photosynthétique est composé de deux complexes moléculaires principaux qui fonctionnent en série et sont situés sur les membranes des thylakoïdes: le photosystème I (PSI) et le photosystème II (PSII) ; ainsi que d'autres

complexes membranaires (cytochrome *b6/f*, ATP synthase) et des transporteurs d'électrons mobiles (plastoquinone, plastocyanines *etc.*) (**Figure 26**).

Au cours du processus photosynthétique, l'énergie lumineuse est captée par les phycobilisomes et des antennes chlorophylliennes (PSII et PSI). Cette énergie permet l'oxydation d'une molécule d'eau, ce qui génère un gradient de protons et un transfert d'électrons. Ces derniers vont suivre une chaîne de transfert et seront utilisés pour l'assimilation des nutriments et la production de molécules organiques. Le gradient de proton va quant à lui permettre la synthèse d'ATP.



Les thylakoïdes

Les thylakoïdes sont un ensemble de membranes situées dans le cytoplasme des cyanobactéries. Entre ces membranes, il y a un espace intérieur appelé lumen.

On retrouve les principaux éléments nécessaires à la photosynthèse dans la membrane des thylakoïdes : le PSI, le PSII toujours du côté cytoplasmique pour recevoir le maximum de lumière, le complexe *b6/f* se trouve partout sur les thylakoïdes, l'ATP synthase se trouve à proximité des zones d'empilements appelées « grana ».

Les phycobilisomes

Les phycobilisomes sont des grands complexes protéiques utilisés par les cyanobactéries comme des antennes collectrices de photons. Les phycobilisomes sont attachés au PSII sur le côté cytoplasmique des membranes des thylakoïdes.

Les photons vont exciter les pigments photosynthétiques des phycobiliprotéines et transférer l'énergie au photosystème II.

Ce complexe est constitué à 80% de phycobiliprotéines (PBP) arrangées en antennes et maintenues par des linkers. Les PBP sont constituées d'une association de différents pigments, les plus abondants étant la phycocyanine (PC) qui constitue le noyau et l'allophycocyanine (APC) qui constitue les antennes. Certaines espèces possèdent aussi de la phycococerythrine (PE) ou de la phycoerythrocyanine (PEC) au niveau de l'extrémité des antennes (**Tableau 3**).

Pigments	Abréviation	Longueur d'onde d'absorption	Localisation
Phycocyanine	PC	570 – 650nm	Noyau
Allophycocyanine	APC	555 – 620 nm	Antennes périphériques
Phycococerythrine	PE	520-570 nm	Extrémités des antennes
Phycoerythrocyanine	PEC	570 – 595 nm	Extrémités des antennes

Tableau 3 : Longueur d'onde d'absorption des pigments dans les cyanobactéries

Les phycobilines sont des pigments proches des chlorophylles qui absorbent à des longueurs d'ondes plus basses, ce qui confère aux cyanobactéries un avantage évolutif et leur permet de ne pas entrer en compétition directe avec d'autres organismes photosynthétiques et d'atteindre des niches écologiques différentes.

Les phycobilisomes représentent près de la moitié des protéines solubles de la cellule et en cas de carence en azote ou carbone, elles sont dégradées pour recycler l'azote et le carbone.

Les antennes qui captent l'énergie lumineuse sont attachées à un des trois noyaux qui reçoivent les électrons qui sont ensuite transférés aux centres photochimiques dans le PSII où ils sont piégés par une paire spéciale de chlorophylle a.

La chlorophylle et les caroténoïdes

Les cyanobactéries peuvent utiliser presque tout le spectre du visible grâce aux différents pigments qu'elles contiennent. En effet grâce à leurs antennes collectrices de lumière décrites précédemment, elles peuvent absorber des radiations solaires entre 550 et 650 nm (Glazer 1984). De plus elles possèdent des chlorophylles qui montrent un maximum d'absorption entre 430-450 nm et 640-670 nm et des caroténoïdes pouvant absorber entre 420-480nm (Mimuro and Katoh 1991) (**Figure 27**).

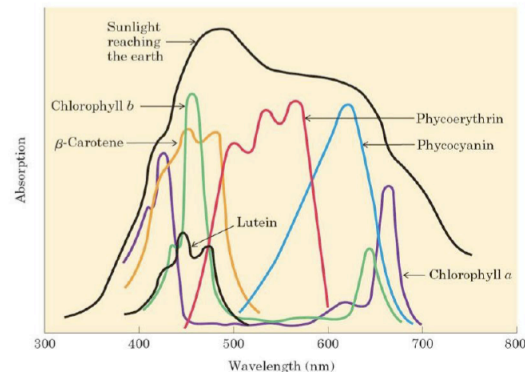
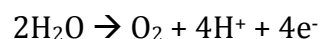


Figure 27 : Spectre d'absorption des différents pigments des cyanobactéries (d'après Nelson, 2004)

Le photosystème II

Le photosystème II (PSII) est responsable de l'oxydation de la molécule d'eau qui génère des électrons, des protons et de l'oxygène moléculaire. Il reçoit l'excitation des phycobilisomes et de son système d'antennes collectrices (les chlorophylles a) et joue un rôle de donneur primaire d'électrons.



Cette réaction nécessite beaucoup d'énergie car elle est thermodynamiquement difficile à réaliser.

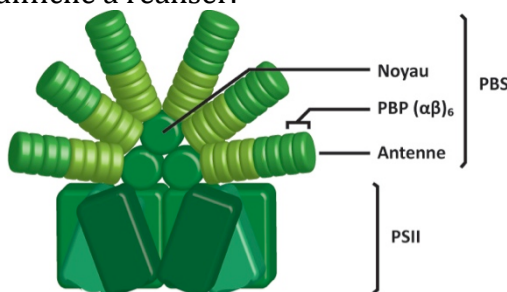


Figure 28 : Le complexe photosystème II et phycobilisomes

Le PSII est un homo-dimère composé de protéines transmembranaires et extrinsèques abritant le site catalytique de dégagement d'oxygène.

La lumière excite les chlorophylles qui transfèrent les électrons de proche en proche par différents cofacteurs et caroténoïdes jusqu'au site métallique qui a fixé en parallèle une molécule d'eau par un de ses ions Mn^{2+} (**Figure 28**).

Le site métallique va oxyder la molécule d'eau et former du dioxygène, puis va transférer le pouvoir réducteur à des plastoquinones qui se détachent du complexe et sont transférées au milieu transmembranaire puis au cytochrome *b6/f*.

Le complexe cytochrome *b6/f*

Le cytochrome *b6/f* est un complexe enzymatique dimérique riche en fer (3 hèmes, un centre [FeS]) situé dans les membranes des thylakoïdes qui fonctionne comme une pompe à protons. Ce complexe reçoit les électrons depuis le pool de plastoquinones, puis ces électrons sont transférés à des petites protéines solubles à cuivre, les plastocyanines qui transfèrent les électrons au PSI. En parallèle le cytochrome *b6/f* transfère des protons du cytoplasme au lumen thylakoïdal, ce qui augmente le gradient de protons.

Chez les cyanobactéries, le cytochrome *b6/f* peut interagir avec différents partenaires. Il intervient à la fois dans la photosynthèse et la respiration, ce qui fait de lui un élément indispensable à la croissance des cyanobactéries. Il est également impliqué dans le transfert cyclique des électrons lorsque le NADP⁺ n'est pas disponible. Il accepte les électrons de la ferrédoxine réduite ce qui crée un gradient de protons qui permet la formation d'ATP par l'ATP synthase.

L'ATP synthase

Une des formes d'énergie les plus utilisées par le vivant est l'ATP. Celui-ci intervient dans de nombreuses réactions comme le transport actif, la synthèse d'ADN, la synthèse de polysaccharides *etc.* L'ATP synthase est un complexe protéique enzymatique qui va synthétiser de l'ATP à partir de l'ADP, de phosphate et des protons introduits dans le lumen thylakoïdal par le PSII et le complexe cytochrome *b6/f*.

Les protons suivent le gradient électrochimique et traversent la bicouche lipidique (du lumen au cytoplasme) en passant par le « rotor » de l'ATP synthase, ce qui entraîne une série de changements conformationnels et la phosphorylation de l'ADP. L'ATP est synthétisé dans le cytoplasme et peut être utilisée rapidement par les différents métabolismes.

Le photosystème I

Le photosystème I (PSI) fut le premier complexe photosynthétique à être découvert, il est responsable du transfert d'électrons entre la plastocyanine et la ferrédoxine. Il peut être de forme monomérique ou trimérique. Il est capable de collecter la lumière par une antenne collectrice (composée de chlorophylle a et caroténoïdes).

Chez les cyanobactéries le PSI possède différents partenaires. Il reçoit les électrons de la plastocyanine ou du cytochrome *c6* lors de carence en cuivre et transfère les électrons à la ferrédoxine ou à la flavodoxine en cas de carence en fer. Par ailleurs, dans les cellules le PSI est 3 à 5 fois plus abondant que le PSII. Il est également responsable du transfert cyclique des électrons.

La ferrédoxine / flavodoxine

Les électrons qui proviennent du photosystème I vont réduire une ferrédoxine. Il existe neuf gènes codant des ferrédoxines chez les *Synechocystis*, dont la ferrédoxine I qui est essentielle (Mazouni *et al.*, 2003). Ce sont des protéines de faible poids

moléculaire (6-14kDa) comportant un cluster (2Fe-2S ou 4Fe-4S ou 3Fe-4S). Une fois réduite, la ferrédoxine va répartir les électrons à différentes voies métaboliques : l'assimilation du soufre et de l'azote ainsi que le métabolisme du carbone (Figure 29).

Bilan sur la photosynthèse

La photosynthèse est un métabolisme énergétique abondant et efficace. Elle nécessite une machinerie complexe qui met en place une innovation métabolique cruciale: elle permet de capter l'énergie solaire grâce à des pigments photosynthétiques (phycobilisomes, chlorophylle et les caroténoïdes) et d'utiliser cette énergie lumineuse pour oxyder la molécule d'eau par le photosystème II. Cette réaction produit de l'énergie redox, de l'oxygène et des protons. Les électrons produits sont soit utilisés pour régénérer les pigments photosynthétiques, soit pour réduire la plastoquinone puis le cytochrome *b6/f* qui va faire entrer des protons dans le lumen.

Ensuite, ces électrons vont atteindre le photosystème I et finalement réduire la ferrédoxine (du côté cytoplasmique), qui va à son tour distribuer les électrons à différentes voies d'assimilation (assimilation du soufre et du carbone, métabolisme du carbone). Une partie de ces électrons pourront être utilisés pour réduire le NAD(P)H pour former des molécules organiques à partir du CO₂ fixé par le cycle de Calvin.

En parallèle, le gradient de protons va permettre la synthèse d'ATP par l'ATP synthase et l'oxygène pourra être utilisé comme accepteur d'électrons pour la respiration.

On pourra noter qu'une partie des électrons photosynthétiques seront redirigés vers l'hydrogénase et permettront la synthèse d'hydrogène dans certaines conditions environnementales (Figure 29). Le chapitre suivant traitera de l'hydrogénase Hox chez *Synechocystis*.

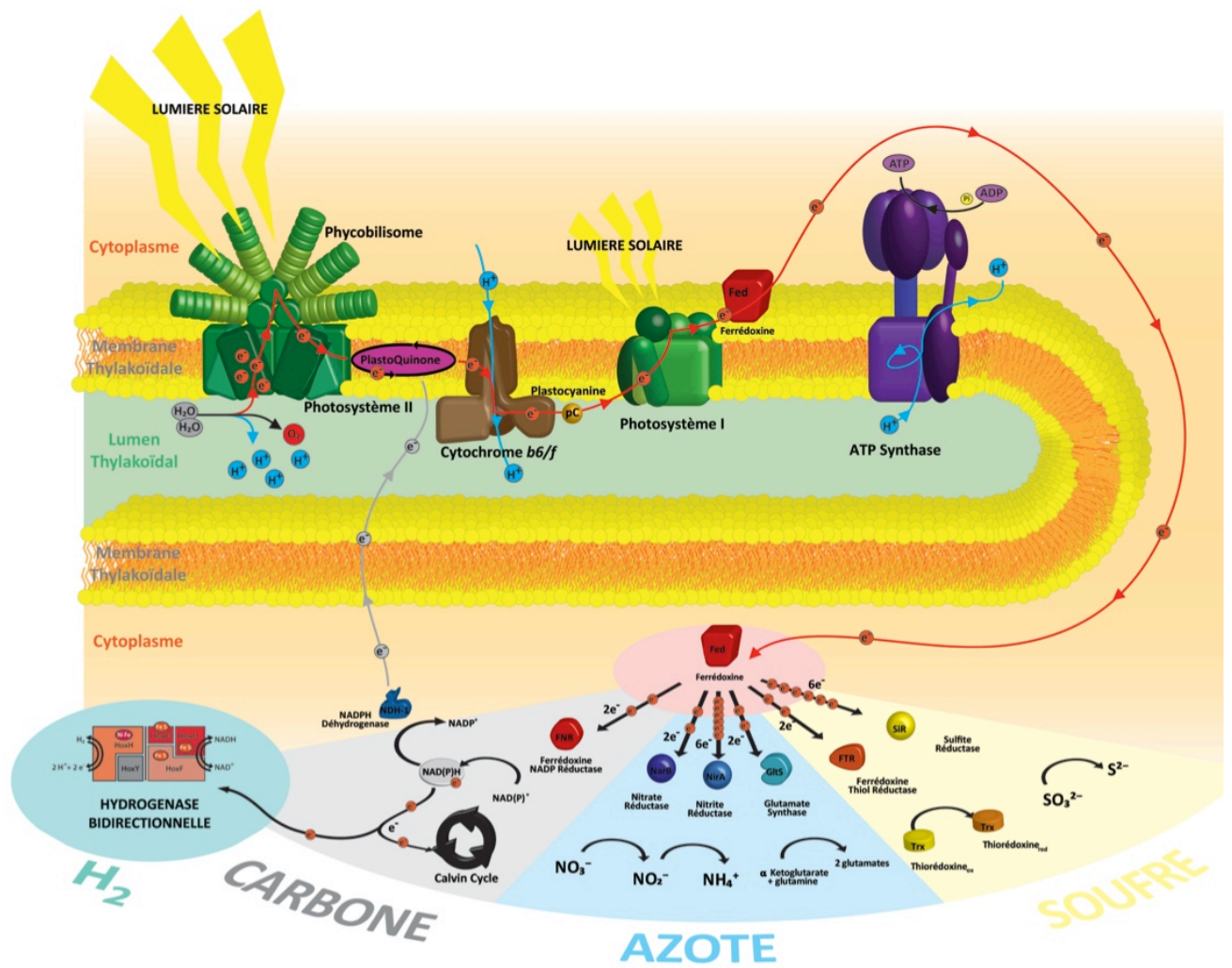


Figure 29 : Chaîne de transfert d'électrons photosynthétiques et le métabolisme d'hydrogène

Chapitre IV : L'hydrogénase bidirectionnelle Hox

HYDROGENASE BIDIRECTIONNELLE HOX

LE METABOLISME DE L'HYDROGENE CHEZ CERTAINES CYANOBACTERIES

Chez les cyanobactéries, il existe deux types d'enzymes qui produisent du H₂

- la nitrogénase, décrite au chapitre précédent, qui lors de la fixation de l'azote atmosphérique (N₂) produit de l'H₂ comme sous-produit de la réaction dans des cellules spécialisées (hétérocystes) lors d'une carence NO₃ ou NH₄. La fixation de l'azote atmosphérique nécessite une grande quantité d'énergie.
- L'hydrogénase bidirectionnelle présente chez au moins 10 cyanobactéries (selon cyanobase), et notamment chez *Synechocystis* qui fait l'objet de ces travaux.

L'HYDROGENASE BIDIRECTIONNELLE HOXEFUYH

Synechocystis possède une seule enzyme impliquée dans la production et la consommation d'hydrogène : une hydrogénase bidirectionnelle à centre [NiFe] appelée Hox pour « Hydrogen Oxydation »

Histoire

Dans les premières publications, les hydrogénases bidirectionnelles furent décrites comme étant composées de quatre sous-unités HoxFU (partie diaphorase) et HoxYH (partie hydrogénase) (Schmitz *et al.*, 1995). L'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis* fut décrite pour la première fois par Appel et Schultz en 1996 comme une enzyme à nickel qui réduit le NAD(P)⁺ et liée à la respiration (Appel and Schultz, 1996). En 2002, les travaux de Schmitz démontrèrent qu'une cinquième sous-unité HoxE co-purifiait avec l'hydrogénase de *Synechocystis* et *Synechococcus* sp. PCC 6301 et faisait partie de la partie diaphorase (Schmitz *et al.*, 2002).

Généralités

L'hydrogénase Hox de *Synechocystis* fait partie des hydrogénases NiFe du groupe 3 et du sous-groupe 3d (voir chapitre hydrogénase). Elle produit de l'hydrogène dans certaines conditions environnementales, décrites ultérieurement, selon la réaction réversible:



La source de ces électrons est le NAD(P)H, issu principalement de la photosynthèse et du catabolisme des sucres (Tamagnani *et al.*, 2007 ; Ghirardi *et al.*, 2009)

Caractéristiques et structure

L'hydrogénase est composée d'une partie diaphorase (HoxEFU) et d'une partie hydrogénase (HoxYH), qui forment une enzyme hétéropentamérique (**Figure 30**; Tamagnini *et al.*, 2007). Selon certains auteurs HoxEFUYH existe sous forme de dimère (HoxEFUYH)₂ chez *Synechocystis* (Schmitz *et al.*, 2002).

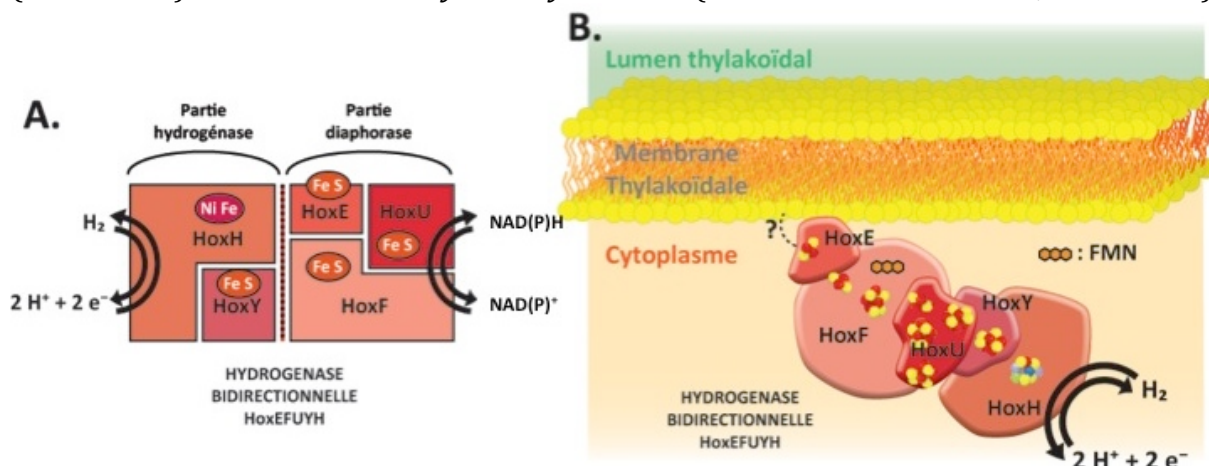


Figure 30 : Vues schématiques de l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis* (d'après la thèse de J. Dutheil 2013 et Eckert *et al.*, 2012)

La partie diaphorase transfère les électrons, fournis par l'oxydation du NAD(P)H en NAD(P)⁺, à la partie hydrogénase qui produit de l'hydrogène de manière réversible dans certaines conditions environnementales (transition obscurité-lumière, carence en soufre *etc.*, voir paragraphe suivant).

C'est dans la sous-unité HoxH que s'effectue la réaction de production ou de consommation de l'hydrogène (Tamagnani *et al.*, 2007). La sous-unité HoxH abrite un centre rédox avec un cofacteur [NiFe] coordonné par plusieurs cystéines qui constitue le site catalytique de l'enzyme. Le site catalytique est réversiblement inactivé par l'oxygène issu de la photosynthèse, et est rapidement réactivé par le pouvoir réducteur du NAD(P)H (Cournac *et al.*, 2004).

Par ailleurs, la sous-unité HoxY et toutes les sous-unités de la diaphorase possèdent plusieurs motifs cystéines qui coordonnent un ou plusieurs centres rédox impliqués dans le transfert des électrons. HoxF possède en plus un motif de fixation du NAD(P)⁺ et de la flavine mononucléotide (FMN) (Tableau 7).

Sous-unité	Cofacteurs et motifs conservés	Fonctions putatives
HoxE	[2Fe-2S]	Sous-unité d'attachement à la membrane, transfert d'électrons, (respiration)
HoxF	[2Fe-2S], [4Fe-4S], domaine de fixation du NAD(P) ⁺ et de la flavine mononucléotide (FMN)	Transfert d'électrons, (respiration)
HoxU	[2Fe-2S], 3[4Fe-4S]	Transfert d'électrons, (respiration)
HoxY	[4Fe-4S]	Petite sous-unité de la partie hydrogénase, transfert d'électrons
HoxH	[Ni-Fe]	Grande sous-unité de la partie hydrogénase, site catalytique

Tableau 4 : Sous- unités de l'hydrogénase

Transcription

Région génomique des gènes *hoxEFUYH*

L'organisation des gènes *hox* chez les cyanobactéries est très hétérogène, on retrouve généralement les cinq gènes regroupés en deux clusters (**Figure 31** ; Tamagnini *et al.*, 2007). Chez *Synechocystis*, l'hydrogénase (*HoxEFUYH*) est codée par les cinq gènes *hoxEFUYH* (*sll1220*, *sll1221*, *sll1223*, *sll1224*, *sll1226*) regroupés sous forme d'un opéron qui contient également trois ORF de fonctions inconnues (*sll1222*, *sll2420*, *sll1225*) (Appel and Schultz, 1996).

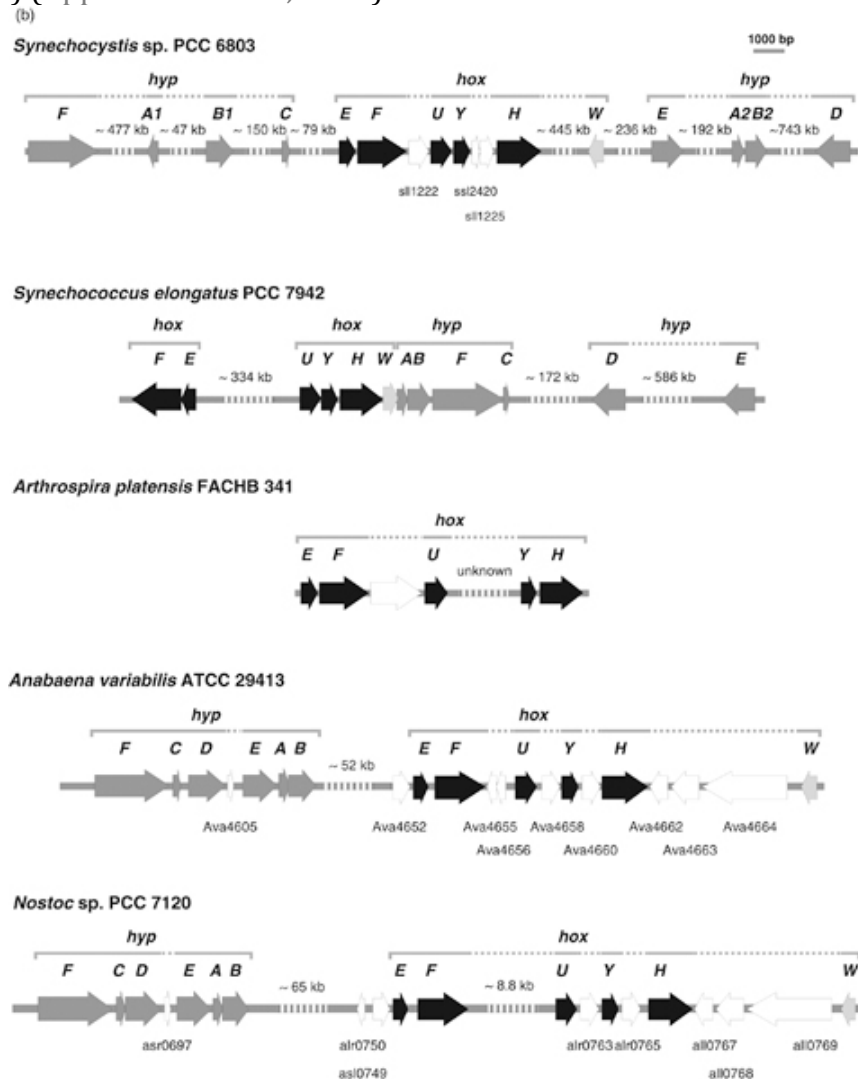


Figure 31: Organisation génomique des gènes *hox* et *hyp* chez certaines cyanobactéries (d'après Tamagnini *et al.*, 2007)

De nombreux travaux sur les ARNm des gènes *hox* de *Synechocystis* montrent que les gènes codant l'enzyme Hox sont faiblement exprimés et transcrits en un ANRM polycistronique dans les conditions standards de croissance (Guntekunst *et al.*, 2005). Cependant ces travaux n'excluent pas la possibilité d'une expression conditionnelle d'ARN messagers alternatifs provenant de la transcription à partir de promoteurs internes, dans certaines conditions de croissance non testées.

Influence du milieu sur le niveau de transcription

Contrairement à plusieurs autres hydrogénases, l'hydrogénase Hox est exprimée en aérobiose et en anaérobiose bien qu'elle soit inactivée par l'oxygène (Appel *et al.*, 2000). Cependant des niveaux d'expression plus élevés ont été détectés dans des conditions micro-anaérobies et anaérobies (Kiss *et al.*, 2009) qui se traduisent par une amélioration de l'activité catalytique. Il a également été montré que les gènes codant l'hydrogénase chez *Synechocystis* suivent un cycle circadien avec une augmentation des transcrits lors d'une illumination et une diminution à l'obscurité (Kusho *et al.*, 2005), ce qui encore une fois semble contradictoire.

Lors d'une carence en azote on peut également constater une augmentation des transcrits *hox* (Antal *et al.*, 2006) et de l'activité hydrogénase (Schultz *et al.*, 2004). Contrairement à une carence en fer, qui va induire une augmentation de la quantité des transcrits mais pas de l'activité hydrogénase (Gutekunst *et al.*, 2006) qui est quant à elle dépendante de la présence de plusieurs centres [FeS] et d'un centre actif [NiFe]. La littérature montre également une augmentation faible et transitoire de la production d'hydrogène dans les cellules carencées en soufre, par des mécanismes qui ne semblent pas faire intervenir l'induction des gènes *hox* (Antal and Lindblad, 2005). L'absence des nutriments N et S nécessaires à la re-synthèse de sous-unités de l'appareil photosynthétique endommagées par la lumière, pourrait entraîner une diminution de la production d'O₂ qui inhibe l'hydrogénase. Ainsi, l'activité de l'hydrogénase est plus durable.

Par ailleurs, trois ARN non codants se trouvant sur l'opéron *hox* ont été mis en évidence (Mitschke *et al.*, 2011):

- *ncr0700* : ARN non codant situé en amont de *hoxE* qui est induit à l'obscurité ;
- *syr1* : ARN non codant en aval de *hoxH* induit sous forte lumière ;
- *as_sll1223* : ARN non codant anti-sens en amont de *hoxE*.

Aucune étude n'a encore été faite sur leur rôle dans la transcription des gènes *hox*, mais leur position sur l'opéron *hox* suggère qu'ils seraient susceptibles de réguler l'expression de l'opéron *hox*.

Les Régulateurs transcriptionnels de l'opéron hox

A ce jour, trois régulateurs de l'hydrogénase ont été décrits: LexA et AbrB1 qui sont des régulateurs positifs de l'opéron *hox*, et AbrB2 qui est un régulateur négatif (voir article dont je suis co-auteur Dutheil *et al.*, 2012 (Partie III)).

Chez les cyanobactéries, LexA est impliqué dans l'assimilation du carbone inorganique et dans le métabolisme de l'hydrogène. Différents travaux montrent que LexA se fixe sur le promoteur de l'opéron *hox* et semble agir comme un activateur direct ou indirect de l'hydrogénase. Ces résultats sont confirmés par l'analyse de souches délétées de LexA qui présentent une activité hydrogénase plus faible (Oliveira and Lindblad, 2005 ; Gutekunst *et al.*, 2005).

En 2008, AbrB1 a été identifié comme un facteur de transcription capable de se fixer sur la région promotrice de l'opéron *hox* et dont la délétion partielle (*abrB1* est essentiel à la viabilité cellulaire) entraîne une diminution de l'activité hydrogénase, tandis que sa surexpression entraîne une augmentation de cette activité (Oliveira and Lindblad, 2008). Ces études suggèrent qu'AbrB1 agit comme un potentiel activateur de l'hydrogénase.

AbrB1 fait partie de la famille des CyAbrB (Cyanobacterial AbrB-like) qui sont des régulateurs transcriptionnels possédant des domaines de fixations à l'ADN dans la région C-terminale (les protéines de type AbrB possèdent normalement leur domaine de fixation du côté N-terminal). Leur fonction chez les cyanobactéries est peu connue mais il semblerait qu'ils interviennent dans la régulation du métabolisme du carbone et de l'azote (Ishii *et al.*, 2008 ; Yamauchi *et al.*, 2011). Chez *Synechocystis* sp. PCC6803, il y a deux CyAbrBs codés par le chromosome (*sll0359* et *sll0822*) et 4 autres protéines présentant un domaine AbrB-like en N-terminal, dont une est codée sur un plasmide (*slr0724*, *ssl1300*, *ssr7040* et *ssl2922*) (Ishii et Hihara 2008, Larson et al. 2011).

AbrB2 est un paralogue d'AbrB1 qui interagit avec la région promotrice de l'opéron *hox* et agit comme un régulateur négatif de l'opéron *hox* (Ishii *et al.*, 2008 ; voir détail dans l'article dont je suis co-auteur Dutheil *et al.*, 2012 ; Article II page 139)). De plus, il a été aussi démontré que le régulateur AbrB2 subit des modifications post-traductionnelles en condition oxydante, ce qui module sa répression sur les gènes *hox* (Sakr *et al.*, 2013 article dont je suis co-auteur voir ; Article III page 157) .

Traduction de l'ARN *hox* et localisation de l'hydrogénase

Aucune étude n'a été faite sur la régulation traductionnelle de l'hydrogénase, seul l'action des protéines Hyp et HoxW ont été étudiées et sont essentielles à l'assemblage et à la maturation de l'hydrogénase (voir paragraphe suivant). Par ailleurs, la localisation subcellulaire de l'hydrogénase est encore débattue chez *Synechocystis* mais il semblerait qu'elle soit attachée à la membrane thylakoïdale par la sous-unité HoxE (Appel *et al.*, 2000).

Assemblage du site actif et maturation de l'hydrogénase

La plupart des informations connues sur la maturation des hydrogénases [NiFe] viennent des études faites chez plusieurs bactéries (*E. coli*, *R. eutropha* etc.) (Voir chapitre Hydrogenase) mais peu d'études concernent l'hydrogénase cyanobactérienne. Cependant on peut s'appuyer sur des systèmes connus pour comprendre le mécanisme chez *Synechocystis*.

A ce jour, l'assemblage et la maturation de la partie hydrogénase (HoxYH) ont fait l'objet de plusieurs études en particulier, sur l'incorporation du site [NiFe] et de la maturation de la sous-unité HoxH (**Figure 32**). Cependant, peu d'études ont été réalisées sur la maturation de la partie diaphorase et sur les processus qui assemblent les centres [Fe-S] dans les diverses sous-unités (). Le processus d'attachement de l'hydrogénase à la membrane reste inconnu, d'autant plus que ce phénomène n'est pas clairement établi.

Assemblage de l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis*
Position des gènes sur le chromosome et rôles des unités d'assemblage

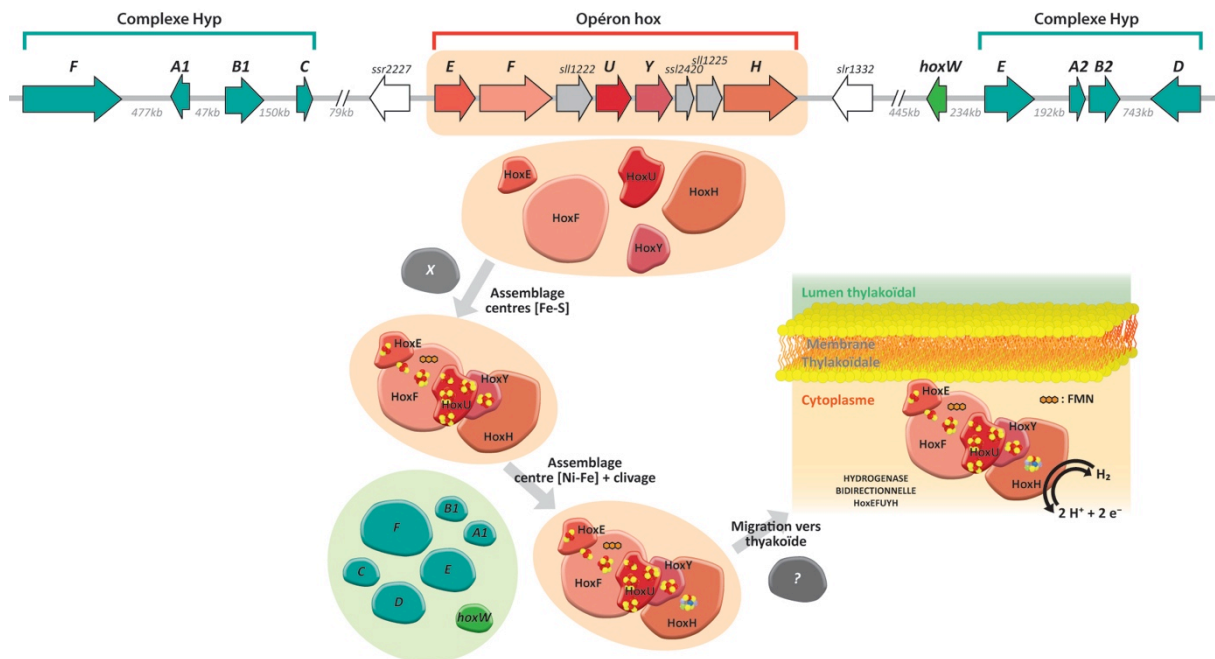


Figure 32 : Assemblage de l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis*

Maturation de la grande sous-unité HoxH

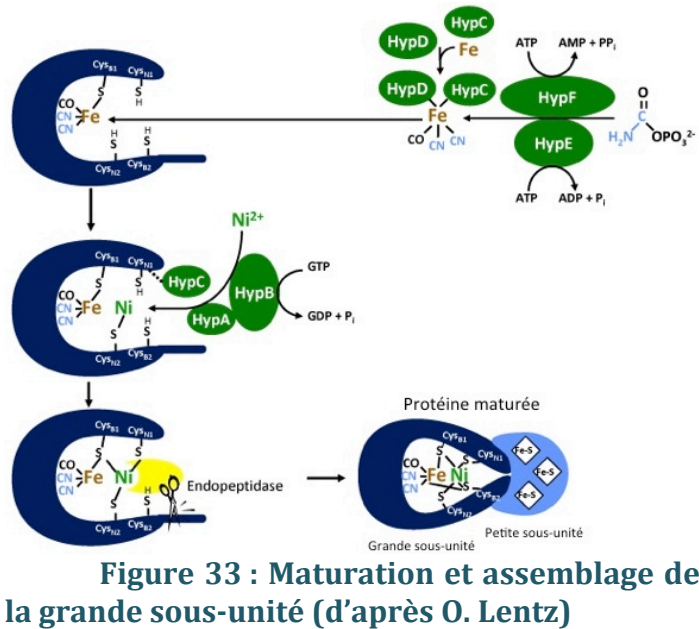


Figure 33 : Maturation et assemblage de la grande sous-unité (d'après O. Lentz)

La maturation de la grande sous-unité HoxH (**Figure 33**) est un processus complexe qui fait intervenir deux types de protéines : les protéines HypABCDEF qui incorporent le site métallique NiFe et la protéase HoxW qui clive la sous-unité HoxH, permettant à l'enzyme d'être active.

L'assemblage et la maturation de cette sous-unité seront détaillés dans les paragraphes suivants.

Les protéines HypABCDEF imoiquées dans l'assemblage du centre NiFe

Le site catalytique $\text{NiFe}(\text{CN})_2\text{CO}$ de l'enzyme Hox (**Figure 34**) est assemblé grâce à six protéines hyp (*HypABCDEF*).

Ce processus fait intervenir différentes étapes :

- la synthèse des ligands CO et CN ;
- la liaison entre les ligands et l'atome de fer ;
- l'incorporation du fer dans l'apoprotéine ;
- l'incorporation du nickel.

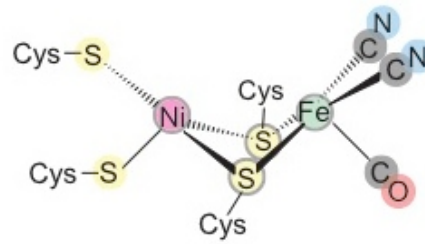


Figure 34 : Structure du site actif [NiFe]

Les gènes *hypABCEF* furent caractérisés pour la première fois chez *E. coli*, leur délétion entraîna une perte de l'activité des trois hydrogénases d'*E. coli* et ils furent appelés *hyp* (hydrogenase pleiotropically). On retrouve des homologues dans tous les organismes contenant une hydrogénase [NiFe] (Böck *et al.*, 2006).

Par homologie de séquences chez *Synechocystis*, des homologues des gènes *hypABCDEF* furent caractérisés (**Figure 35**). Par contre, de manière étonnante les gènes *hypA* et *hypB* possèdent deux homologues chacun ; *hypA1*, *hypA2*, *hypB1* et *hypB2*. Cependant la délétion des gènes *hypA2* et *hypB2* n'affecte pas l'activité hydrogénase, il semblerait donc que ces gènes ne soient pas impliqués dans la maturation de l'hydrogénase, contrairement à *hypA1B1CDEF* dont la délétion entraîne une perte totale de l'activité hydrogénase (Hoffmann *et al.*, 2006). L'organisation génomique des gènes *hyp* varie selon les organismes (**Figure 31**). En général on retrouve ces gènes regroupés dans une région chromosomique mais on peut les retrouver éparpillés dans tout le génome comme chez *Synechocystis* (Tamagnini *et al.*, 2007)

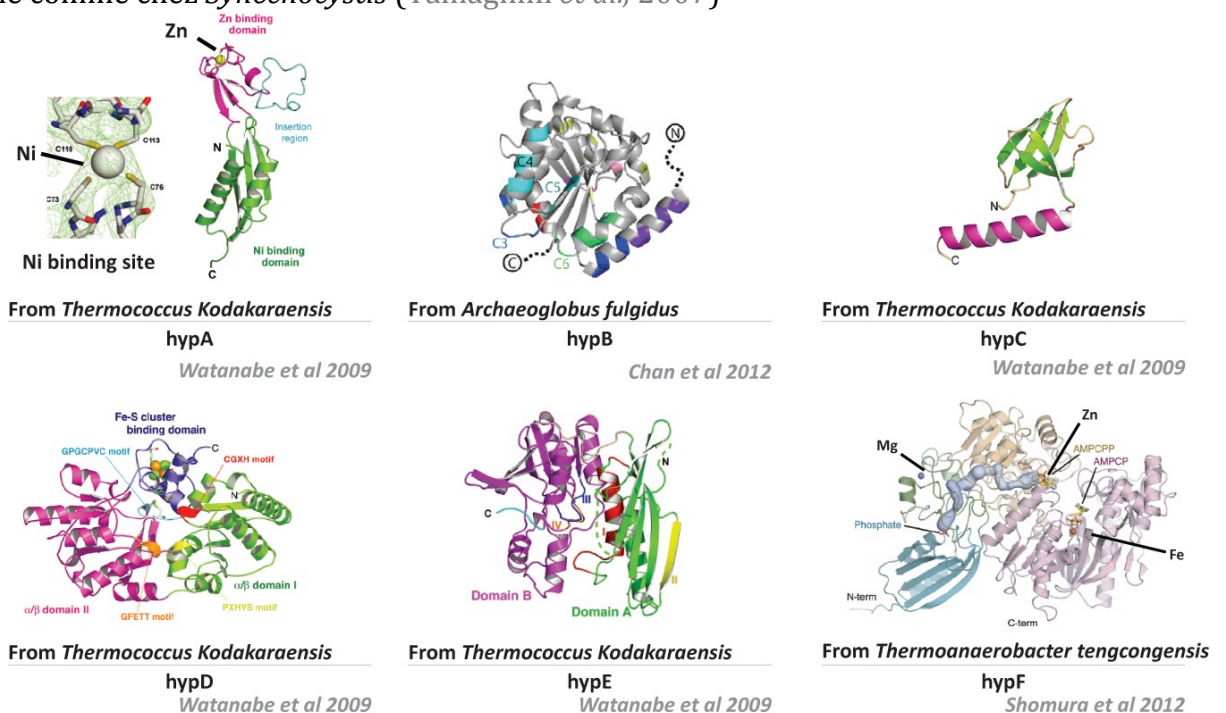


Figure 35 : La structure des protéines HypABCDEF

HypA1 (appelé HypA par la suite) est un dimère contenant du zinc, qui agit comme une métallo-chaperonne et intervient dans l'insertion de l'atome de nickel dans le site catalytique situé dans HoxH.

HypB1 (appelé HypB par la suite) est une GTPase qui régule l'interaction de HypA avec la sous-unité HoxH, et catalyse l'hydrolyse du GTP pour faciliter l'insertion du nickel. L'ajout de nickel dans le milieu compense une partie de la délétion de *hypA* et *hypB* (Hoffmann *et al.*, 2006).

HypC est une petite protéine chaperonne qui interagit avec HoxH et HypD pour faciliter l'insertion du site métallique.

La sous-unité **HypD** est une protéine monomérique qui intervient dans le transfert de l'atome de Fe à l'apoprotéine, c'est la seule à posséder un centre redox de type [4Fe-4S] (Bock *et al.*, 2006).

HypE est une protéine monomérique qui possède un domaine de liaison à l'ATP et une activité ATPase faible (Blokesch *et al.*, 2004) qui va transférer le ligand (CO)(CN)₂Fe au complexe HypC/HypD.

HypF est une metalloprotéine monomérique avec un motif à « doigt de Zinc ». Elle contient un atome de fer, un atome de manganèse et un atome de zinc. Elle est impliquée dans la formation des ligands CN par l'hydrolyse du carbamoyl phosphate (CP) et d'ATP.

Comme décrit précédemment, lors de l'assemblage du site actif [NiFe], l'atome de fer est incorporé en premier puis l'atome de nickel en second (**Figure 33**). Le processus est résumé ci-dessous :

HypF forme un ligand CN à partir du phosphate carbamoyl (CP) et de l'hydrolyse d'ATP, et un ligand CO à partir d'une source inconnue ; ces ligands vont se lier à HypE. En parallèle, HypC forme un complexe avec HypD et accepte un atome de Fe. Puis, deux protéines HypE, transfèrent leurs ligands CN au dimère HypC/HypD. Ce transfert nécessite des électrons, HypD étant la seule protéine d'assemblage qui contient un centre redox, on suppose qu'elle est impliquée dans ce processus. Tandis que HypC qui est liée à HypD interagit avec l'apoprotéine HoxH (HoxHp – HoxH précurseur), ce qui libère HypD. Ensuite, HypC transfère le ligand (CO)(CN)₂Fe à HoxHp mais reste attaché pour maintenir HoxHp dans une conformation ouverte.

La deuxième phase fait intervenir HypA et HypB qui ont fixé précédemment un atome de nickel et transfèrent cet atome à la sous-unité HoxHp grâce à l'hydrolyse de GTP par HypB. HypC se décroche alors de la sous-unité HoxHp qui peut être clivée par HoxW (décrit ultérieurement), ce qui complète le processus de maturation de la grande sous-unité (Blöck *et al.*, 2006 ; Tamagnini *et al.*, 2007).

Peu d'études ont été faites sur la régulation des gènes *hyp* chez les cyanobactéries. Chez *Lyngbya majuscula* les promoteurs des gènes *hyp* possèdent des régions de fixation des régulateurs transcriptionnels LexA et NtcA. Chez *Synechocystis* il a été montré (voir précédemment) que LexA se fixe dans la région promotrice de l'opéron *hox*, cependant aucune étude n'a été faite sur les gènes *hyp*.

La protéase HoxW

Le clivage de la grande sous-unité HoxH par la protéase HoxW constitue la dernière étape de maturation de HoxH. Elle ne peut avoir lieu qu'après insertion du site

actif dans l'apoprotéine : l'extension C-terminale devient alors accessible et peut être clivée par HoxW.

Contrairement aux gènes *hyp* qui peuvent assembler le site actif de l'hydrogénase uptake et de l'hydrogénase bidirectionnelle, l'endopeptidase HoxW est spécifique de l'hydrogénase bidirectionnelle. HoxW reconnaît le nickel qui est coordonné par des ligands CN ainsi que la structure tertiaire de l'ensemble de la sous-unité HoxH qui lui permet de se fixer sur le domaine C-terminal de HoxH qui est accessible. Puis, HoxW clive HoxH après un résidu histidine à la fin d'une séquence consensus : DPCLSCSTH, ce qui libère une séquence de 25 à 32 acides aminés selon les organismes (25 acides aminés chez *Synechocystis*). Une fois clivée, la sous-unité HoxH maturée adopte une conformation qui permet à une cystéine C-terminale de lier les deux métaux et d'obtenir un site bi-métallique actif. Finalement la sous-unité HoxY va s'assembler à la sous-unité HoxH maturée pour former la partie hydrogénase active (Tamagnini *et al.*, 2007). Cependant, on note que de récents travaux ont montré que la sous-unité HoxY peut s'assembler à la sous-unité HoxHp non maturée, ce qui suggère que le clivage peut avoir lieu après assemblage de la sous-unité HoxH avec la sous-unité HoxY (Eckert *et al.*, 2012).

Maturation de la petite sous-unité HoxY

La petite sous-unité HoxY possède trois centres [Fe-S] impliqués dans le transfert d'électrons. Sa maturation doit se faire en parallèle mais indépendamment de la sous-unité HoxH ; peu de données sont disponibles sur ce processus. Chez *Ralstonia eutropha* quatre gènes seraient impliqués dans la maturation de la petite sous-unité (Burgdorf *et al.*, 2005) mais chez *Synechocystis* aucune étude sur la maturation de HoxY n'a encore été réalisée, par comparaison de séquence on trouve un gène homologue à HoxO de *R. eutropha* mais dont la fonction est inconnue.

Rôle biologique de l'hydrogénase

La machinerie de production d'H₂ est clairement imbriquée dans le métabolisme global de la cellule, puisqu'elle est liée à :

- La production d'énergie (ATP) et de pouvoir réducteur NAD(P)H;
- Le métabolisme redox (transferts d'électrons notamment photosynthétiques);
- L'homéostasie des métaux (Fe, Ni et Zn) et du soufre;
- La synthèse, l'assemblage et la réparation des centres redox Ni-Fe et Fe-S (les centres [Fe-S] sont généralement coordonnés par l'atome de soufre des cystéines).

Cependant la fonction physiologique de l'hydrogénase HoxEFUYH n'est pas bien connue. Plusieurs rôles ont été proposés à l'hydrogénase bidirectionnelle en fonction des conditions étudiées.

La respiration

Chez les cyanobactéries, certaines sous-unités du complexe I impliquées dans la respiration sont absentes, or la partie diaphorase des hydrogénases présente des similitudes avec certaines sous-unités manquantes, il a donc été proposé que la diaphorase fasse partie du complexe I (Appel and Schulz, 1996). Cette hypothèse a été remise en question puisque plusieurs cyanobactéries qui ne possèdent pas

d'hydrogénase possèdent une respiration équivalente à celles qui possèdent une hydrogénase (Tamagnini *et al.* 2007 ; Kiss *et al.*, 2009).

Rôle dans la fermentation

Plusieurs études montrent que les cyanobactéries qui effectuent la fermentation et possèdent une hydrogénase produisent de l'hydrogène pendant la fermentation comme co-produit. Par exemple, *Gloeocapsa apicola*, possède une hydrogénase réversible et montre une haute productivité d'hydrogène avec une faible production d'éthanol et de lactate, ce qui suggère que la cyanobactérie utilise l'hydrogénase pour générer du NAD(P)^+ . Ceci s'explique par le fait que la fermentation entraîne une accumulation de NAD(P)H dans la cellule. Cette accumulation de NAD(P)H va être consommée par l'hydrogénase pour générer du NAD(P)^+ , et ainsi permettre d'équilibrer l'homéostasie redox $\text{NAD(P)H}/\text{NAD(P)}^+$ (Troshina *et al.*, 2002). Lors de la fermentation, l'enzyme pourrait donc intervenir chez les cyanobactéries en agissant comme un médiateur dans l'évacuation d'un excès de pouvoir réducteur dans des conditions anaérobies (**Figure 36**).

Par ailleurs, l'analyse des séquences de 58 génomes cyanobactériens montre que toutes les cyanobactéries possédant les gènes *hox* possèdent également le gène codant pour la pyruvate ferrédoxine oxidoreductase (PFOR) (Barz *et al.*, 2010). Il a donc été suggéré que l'hydrogénase pourrait évacuer les électrons issus de la fermentation sous forme d'hydrogène.

Cependant, plusieurs études montrent qu'il peut y avoir une production d'hydrogène dans des conditions non fermentaires (Cournac *et al.*, 2002 ; Carrieri *et al.*, 2011) et que l'hydrogénase pourrait intervenir dans d'autres mécanismes qui peuvent être liés au pool de NAD(P)H .

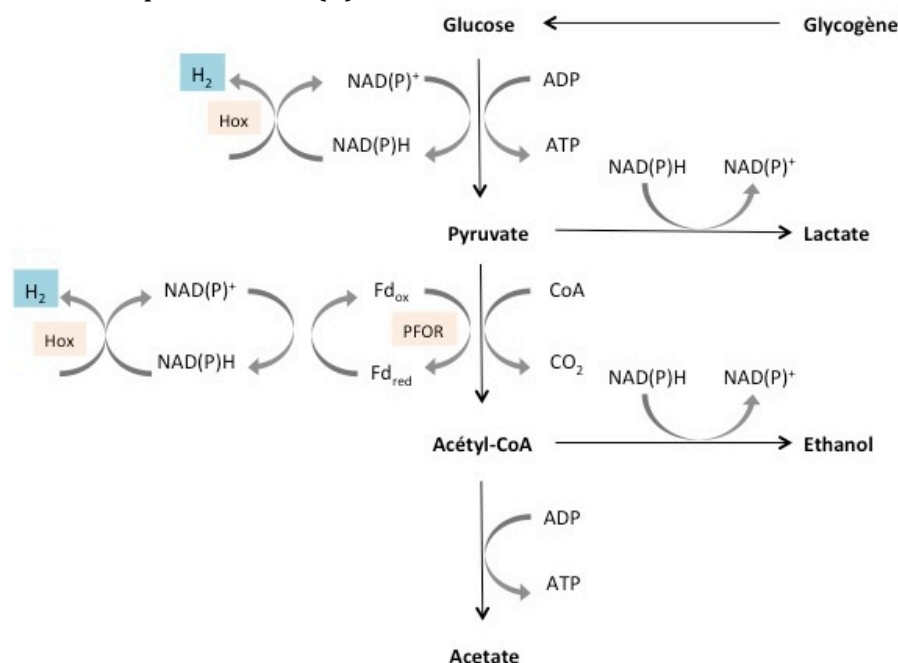


Figure 36 : Schéma général de la fermentation chez les cyanobactéries (d'après Carrieri *et al.*, 2010)

Maintien du pool de NAD(P)H

Chez *Synechocystis*, on observe une production transitoire d'hydrogène lors d'un passage de l'obscurité à la lumière, suivie d'une rapide consommation d' H_2 , en parallèle

à l'assimilation de CO_2 et avant la production d'oxygène par la photosynthèse (Cournac *et al.*, 2004). La diminution d'hydrogène se produit même si le PSII est inhibé, ce qui démontre que ce n'est pas dû à l'inactivation de l'hydrogénase mais à la consommation de l'hydrogène produit. Il a été proposé que l'hydrogénase soit utilisée pour réduire le NAD(P)^+ en NAD(P)H pour contribuer à la fixation de CO_2 quand le pool d'électrons s'oxyde facilement (transitions lumineuses). D'autres travaux sur *Synechococcus* sp. PCC7002, montrent que la délétion de la lactate déshydrogénase (Dldh) qui consomme du NAD(P)H pendant la fermentation entraîne une production plus importante d'hydrogène avec un ratio $\text{NAD(P)H}/\text{NAD(P)}^+$ supérieur (McNeely *et al.*, 2010).

Ces résultats suggèrent que l'hydrogénase bidirectionnelle a un rôle de maintien du ratio $\text{NAD(P)H}/\text{NAD(P)}^+$ en réponse aux changements environnementaux (Figure 37).

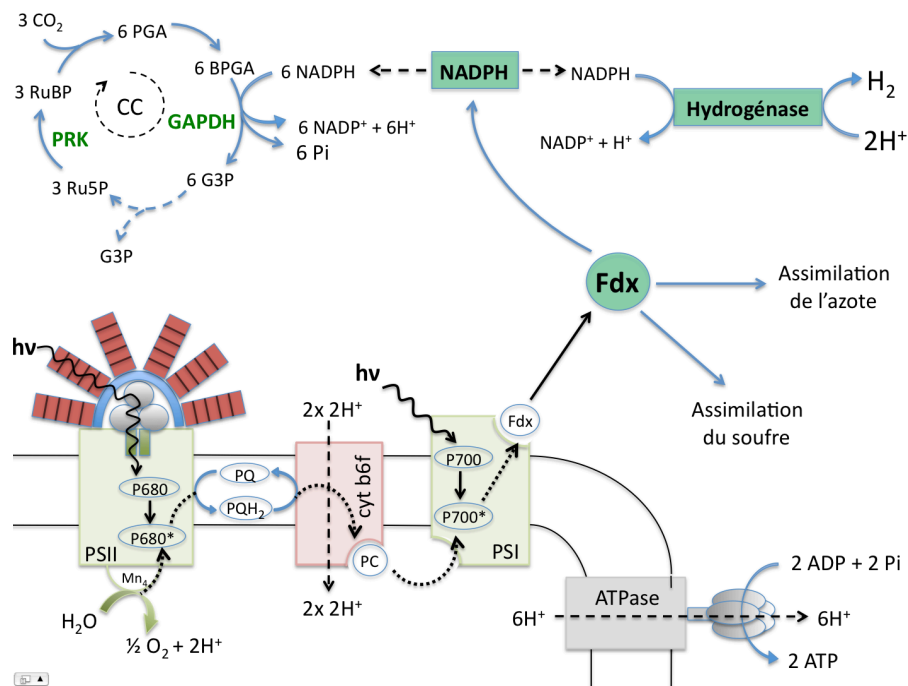


Figure 37 : Schéma général de la photosynthèse et du cycle de Calvin H2

Régulateur redox

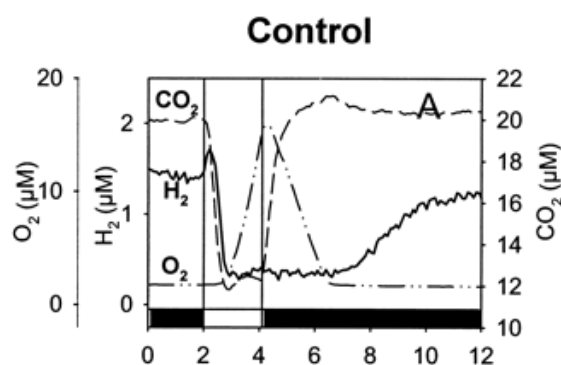
Les données discutées précédemment montrent que l'hydrogénase est nécessaire dans certaines conditions environnementales et qu'elle n'est présente que chez certaines cyanobactéries. Cependant sa présence confère un avantage évolutif dans certaines conditions, par exemple dans des conditions de micro-anaérobiose ou anaérobiose stricte, les cyanobactéries ne peuvent pas effectuer la respiration puisqu'elles n'ont pas l'accepteur final O_2 . Si dans ces conditions la cyanobactérie se trouve avec une trop grande quantité de NAD(P)H , elle va pouvoir utiliser l'hydrogénase pour produire du NAD(P)^+ et éviter d'utiliser une molécule carbonée, coûteuse en ATP.

Par ailleurs, l'hydrogénase peut également agir en tant que consommatrice d'hydrogène dans la cellule. L'hydrogène serait une sorte de réserve d'électrons qui pourrait être récupérée si l'environnement changeait rapidement (ex: transition lumière obscurité).

On peut également remarquer qu'il existe trois voies qui entrent en compétition avec l'hydrogénase dans la consommation de NAD(P)H : la respiration, l'assimilation du nitrate, et l'assimilation du CO_2 . En effet, le mutant de délétion du complexe NDH-1 qui

sert de médiateur d'électrons entre le NAD(P)H et le pool de plastoquinone présente une production plus longue d'hydrogène à la suite d'un transfert de l'obscurité à la lumière contrairement au sauvage (Cournac *et al.*, 2004 ; **Figure 38**).

On peut aussi remarquer que la mutation des voies métaboliques d'assimilation du nitrate augmente la production d'hydrogène chez *Synechocystis* (Guttham *et al.*, 2006 ; Baebprasert *et al.*, 2011). Ces données montrent que l'hydrogénase se trouve à un carrefour avec d'autres voies métaboliques comme l'assimilation du nitrate, la photosynthèse et la respiration par l'intermédiaire du pool de NAD(P)H.



Valve à électrons pendant la photosynthèse

Il a été proposé que l'hydrogénase agisse comme une valve à électrons pour évacuer du H₂ (sous forme de gaz) le surplus des électrons générés par la photosynthèse. En effet, des études montrent que dans une souche ΔhoxH (délété de la sous-unité HoxH), la vitesse d'oxydation et de réduction du PSI diminue légèrement, ce qui suggère un rôle de l'hydrogénase lié à la photosynthèse (Appel *et al.*, 2000). De plus, dans certaines conditions environnementales, rares dans la nature, anaérobiose, obscurité et présence de glucose exogène (qui fournit du NAD(P)H), la production d'hydrogène est faiblement et transitoirement activée lors du ré-éclairage, afin d'évacuer l'excès d'électrons dû à la réactivation (rapide et puissante) de la photosynthèse (Kiss, Kos *et al.* 2009). Ceci suggère que l'hydrogénase permet d'éviter que les électrons excédentaires recombinent avec l'oxygène produit par la photosynthèse, générant ainsi des espèces réactives de l'oxygène (tel le radical superoxyde O₂⁻) qui sont toxiques pour la cellule (voir stress oxydant).

Par ailleurs, l'analyse phénotypique et des études transcriptomiques du mutant ΔabrB2 qui est un régulateur négatif de l'hydrogénase, montrent une régulation du système de protection contre le stress oxydant par ce régulateur AbrB2 (Sakr *et al.*, 2012 voir article dont je suis co-auteur Article III ; Leplat *et al.*, 2013).

De façon surprenante, on peut voir qu'il existe un lien entre l'hydrogénase et le stress oxydant, or aucune publication ne démontre l'avantage physiologique de la présence de l'hydrogénase chez les cyanobactéries soumises à un stress oxydant. Ce qui ouvre la voie à de nouveaux rôles biologiques de l'hydrogénase encore inexplorés.

Chapitre V : Le stress oxydant, le paradoxe de la vie aérobie

GENERALITES

Comme décrit précédemment, l'atmosphère terrestre est devenue oxydante par l'accumulation de l'oxygène, cette nouvelle atmosphère déclenchant l'apparition de la vie aérobie. Cependant, l'oxygène qui est indispensable à la vie aérobie est également dangereux pour tous les êtres vivants, puisqu'il est le principal acteur du stress oxydant. Chez les organismes supérieurs, le stress oxydant est responsable de nombreuses pathologies (cancer, vieillissement, *etc.*), chez les micro-organismes il peut être responsable de la mort cellulaire.

ORIGINES DU STRESS OXYDANT

Chez les organismes aérobies, la respiration est une source de stress oxydant, par exemple chez *E. coli*, l'oxygène produit diffuse dans les cellules, puis est réduit en anion superoxyde et H_2O_2 par l'oxydation des flavoprotéines comme la NADH déhydrogénase II (NdhII) (Imlay, 2003). Chez les organismes photosynthétiques, le stress oxydant provient aussi des électrons et de l'oxygène issus de la photosynthèse (voir chapitre III). En effet le stress oxydant va créer un transfert d'électrons médié par l'oxygène qui va produire des espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS). Il existe également des agents chimiques qui réagissent avec l'oxygène et génèrent des ERO, comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le médanione, le bleu de méthylène *etc.*

Les ERO sont naturellement produites dans les organismes aérobies et peuvent avoir des rôles dans divers processus biologiques ou voies de signalisation cellulaire (Nishida *et al.*, 2000). Leur régulation réside sur un équilibre entre les ERO et les agents antioxydants, cependant ces métabolites sont très instables et dans certaines conditions physiologiques un déséquilibre peut se créer en faveur des ERO : c'est un état de stress oxydant.

LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE

GENERALITES

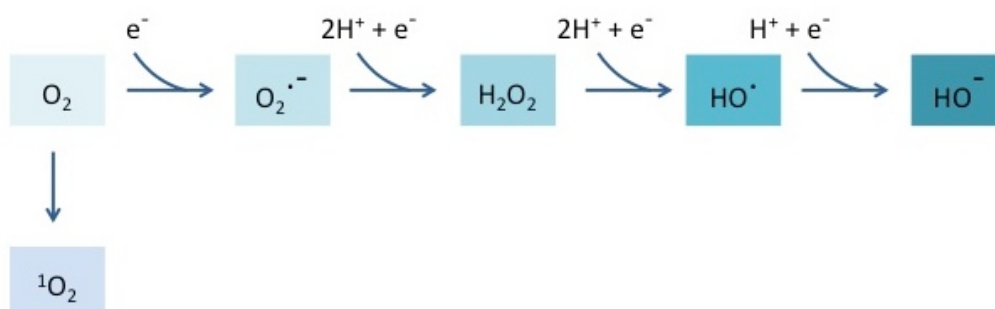


Figure 39 : Espèces réactives de l'oxygène

Le dioxygène (O₂) est une molécule nécessaire à la respiration aérobie et à la phosphorylation oxydative, elle est essentielle pour les organismes aérobies qui l'utilisent comme un fort accepteur final dans de nombreuses réactions. La concentration de dioxygène intracellulaire est en équilibre avec la concentration extracellulaire grâce à sa capacité à diffuser à travers les membranes. Cependant, le dioxygène qui est peu réactif peut subir un transfert d'électrons par des processus redox qui vont changer sa structure vers des espèces hautement plus réactives et dangereuses pour la cellule : les espèces réactives de l'oxygène (**Figure 39**).

CARACTERISTIQUES

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS pour Reactive Oxygen Species) sont des molécules dérivées du dioxygène qui correspondent à différents états d'oxydation du dioxygène. Ce sont des molécules hautement réactives :

- L'oxygène singulet (¹O₂): C'est une molécule caractérisée par deux électrons externes qui ont des spins opposés sur la même orbitale moléculaire. Elle se trouve dans un état excité très instable et peut réagir avec beaucoup d'espèces (ADN, protéines, acides gras, voir paragraphe suivant)
- L'anion superoxyde (O₂^{•-}) : Cette espèce se forme par ajout d'un électron sur la molécule d'O₂ et se retrouve chargée négativement ce qui l'empêche de traverser les membranes. Elle se forme par la réduction incomplète de l'oxygène au cours de la respiration (Fridovich, 1978). La durée de vie de l'anion superoxyde est très courte car il est rapidement dismuté en H₂O₂, cette réaction est souvent catalysée par les superoxydes dismutases (SOD). L'anion superoxyde provoque la destruction des centres Fe-S et libère le fer dans la cellule (Fridovich, 1997). Il est aussi responsable de la réduction du Fe³⁺ en Fe²⁺ qui est suivie de la réaction de Fenton entre le Fe²⁺ et l'H₂O₂ qui produit des radicaux hydroxyles.

$\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$	Haber-Weiss
$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^{\cdot}$	Fenton

- Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) : L'ajout d'un électron et de deux protons à l'anion superoxyde vont former le peroxyde d'hydrogène. Il peut également être formé par des réactions photochimiques naturelles. C'est une espèce non chargée et peu réactive, ce qui lui permet de traverser facilement les membranes. Cependant elle peut oxyder les résidus soufrés (cystéines et méthionines) des acides aminés, ce qui conduit par exemple à la formation de méthionine-sulfoxyde toxique pour la cellule (Gilbert, 1990).
- HO[•] le radical hydroxyle et HO⁻ l'anion hydroxyde : ce sont les deux espèces les plus réactives. Leur haute réactivité limite leur diffusion et leur réactivité se limite au lieu de leur formation. De plus il n'existe pas de mécanisme enzymatique de détoxification, la cellule doit donc prévenir la formation de radical hydroxyde par l'élimination des deux espèces précédentes. Le radical

hydroxyle entraîne l'hydroxylation des bases (puriques et pyrimidiques) et certains acides aminés aromatiques. Il est responsable de la peroxydation lipidique qui entraîne la modification de l'ADN et des protéines (voir paragraphe suivant).

CONSEQUENCES

Les ERO sont capables de réagir avec différentes molécules et à différents niveaux dans la cellule. Elles peuvent être responsables de :

- L'oxydation des acides nucléiques : Ce qui entraîne des coupures simples et double-brins, des modifications ou perte des bases. Par exemple : l'oxygène singulet peut interagir avec les bases nucléiques, comme la guanine et produire la molécule « 8-hydroxydeoxyguanosine » qui cause la cassure des brins. (Sies *et al.*, 1992)
- L'oxydation des protéines par des modifications post-traductionnelles sur les acides aminés et cofacteurs :
 - Au niveau du squelette carboné : l'action de l'hydroxyle sur l'hydrogène d'un acide aminé qui donne un carbone radicalaire et par une suite de réactions, les protéines interagissent entre elles et forment des agrégats. Par conséquent l'activité des enzymes est inhibée.
 - Au niveau de la chaîne latérale des acides aminés : le radical OH[•] peut oxyder tous les acides aminés. La cystéine et la méthionine sont les plus sensibles et peuvent générer des résidus cystéines oxydés et méthionines sulfoxydes (MeSOX). Ces modifications entraînent des « cross-link » entre les protéines qui s'agrègent et provoquent leur inactivation (Davies *et al.*, 2003). Cependant ces modifications sont réversibles et ne semblent pas être fatales pour la fonction de la protéine. En effet, les thiorédoxine (Trx) réduisent les ponts disulfures et les méthionines sulfoxydes réductases (Msr) qui réduisent l'oxydation de méthionines. Il a été suggéré qu'elles agiraient comme antioxydant (Levine *et al.*, 1996).
 - Carbonylation : c'est un type d'oxydation qui entraîne l'ajout d'un groupement carbonyle sur la protéine, ce qui crée un groupement hydroxyle qui peut interagir avec des sucres, des lipides et par conséquent avec d'autres protéines. Ce phénomène est irréversible et les protéines carbonylées sont destinées à la dégradation mais leur aptitude à créer des agrégats peut empêcher cette dégradation et entraîner des dommages irréversibles.
 - Oxydation des centres Fe-S : l'oxydation d'un centre Fe-S peut entraîner son instabilité puis sa dégradation et par conséquent l'inactivation de l'enzyme.
- La peroxydation des lipides : Elle peut se faire à partir d'acides gras polyinsaturés qui possèdent des doubles liaisons carbone-carbone très réactives avec les ERO. Les radicaux hydroxyles ou l'oxygène singulet peuvent entraîner la peroxydation de plusieurs acides gras et créer des réactions en chaîne. La peroxydation des lipides provoque des perturbations de la membrane cellulaire et peut également entraîner la formation de nouvelles espèces radicalaires comme le radical peroxyde (ROO[•]) qui entraîne la modification de l'ADN et des protéines.

LES MECANISMES DE DETOXICATION

LE GLUTATHION

Le glutathion est un tripeptide (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-L-glycine) qui agit comme un tampon redox. Il est impliqué dans la protection des protéines contre le stress oxydant mais également contre des métabolites toxiques (methylglyoxal, formaldéhyde *etc.*), des espèces électrophiles, antibiotiques, stress osmotiques, *etc.* (Naraimsamy *et al.*, 2013, Masip *et al.*, 2006). Il existe sous deux formes : la forme réduite (GSH) à fort pouvoir réducteur et la forme oxydée (GSSG) qui correspond à deux molécules de glutathion liées par un pont disulfure qui se forme en présence de ROS. L'équilibre GSH/GSSG est finement régulé par la cellule, il est de 200 dans des conditions standard chez *E. coli* (Massip *et al.*, 2006). Le glutathion est impliqué dans un processus appelé « glutathionylation », qui consiste en la formation d'un pont disulfure entre le glutathion et des résidus cystéines d'une protéine, en utilisant le NADPH comme pouvoir réducteur. C'est une modification post-traductionnelle réversible qui se produit dans des conditions oxydantes. Le processus de glutathionylation permet de protéger les protéines contre les dommages irréversibles dus à l'oxydation par les ROS, la réduction du pont disulfure est catalysé par les glutarédoxines (Grx) (**Figure 40**).

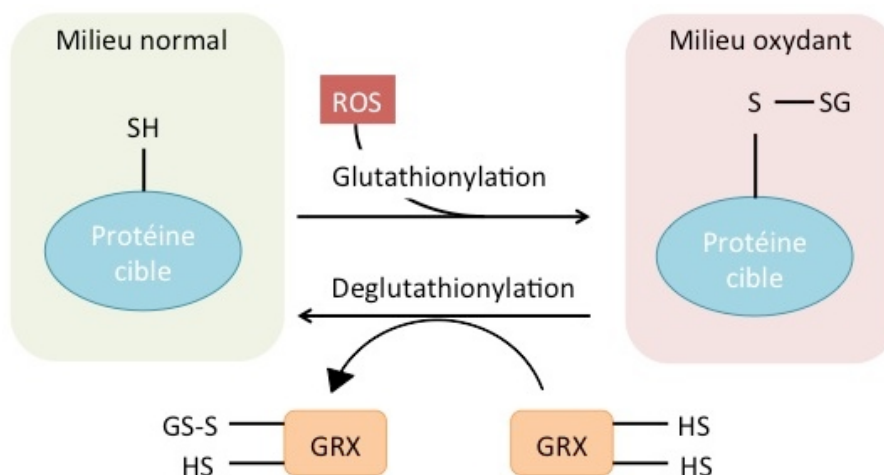


Figure 40 : Processus de glutathionylation et déglutathionylation d'une protéine cible

LES ENZYMES ANTI-OXYDANTES

Superoxyde Dismutase (SOD) et Superoxyde Réductase (SOR)

Les Superoxydes Dismutases (SOD) sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation de deux ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène par un mécanisme métal-dépendant. On les retrouve chez presque tous les organismes aérobies, il en existe plusieurs types caractérisés par le métal contenu dans leur site actif (Fe, Mn, V *ect.*). Dans la cellule, la concentration des SOD est très élevée (20 μ M chez *E. coli* ; Imlay 2008) afin de maintenir la concentration en anion superoxyde à environ 0,1 nM dans la cellule (Imlay and Fridovich, 1991). *Synechocystis* possède une seule SOD à fer (Bhattacharya *et al.*, 2004).

On peut remarquer que les organismes anaérobies stricts possèdent des Superoxydes Reductases (SOR) qui sont moins efficaces que les SOD mais leur permettent de survivre lorsqu'ils sont confrontés temporairement à un milieu contenant de l'O₂ dissous dans l'eau.

Peroxydase et catalases

Les catalases sont des protéines homotétramériques qui catalysent la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau grâce aux propriétés redox des métaux. Elles peuvent être monofonctionnelles hémiques ou monofonctionnelles non hémiques.

Chez les catalases monofonctionnelles hémiques, chaque sous-unité de la protéine contient un atome de fer logé dans le noyau hémique qui est essentiel pour l'activité catalytique de l'enzyme. Chez les catalases monofonctionnelles non hémiques, le site catalytique est composé de deux atomes de manganèse coordonnés à un glutamate et une histidine (Chelikani *et al.*, 2004). *Synechocystis* possède une catalase peroxydase (Jakopitsch *et al.*, 2003).

Les peroxydases sont des petites protéines qui catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et peroxyde organique grâce au pouvoir réducteur du NAD(P)H. La réaction catalytique est similaire à celle des catalases, leur site catalytique est constitué d'une cystéine réactive qui peut être oxydée et entraîne la formation d'eau.

REGULATION DES REPONSES AU STRESS OXYDATIF

L'activation de régulateurs en réponse à un stress oxydant va moduler la transcription de nombreux gènes, pour permettre à la cellule d'élaborer une réponse appropriée au stress auquel elle est confrontée.

Chez *E.coli*, les protéines SoxR et SoxS sont impliquées dans la réponse au stress de type superoxyde. Le régulateur SoxR agit comme un senseur du stress oxydant, qui lorsqu'il est oxydé par l'anion superoxyde va l'activer et permettre la transcription de *soxS*. SoxS est un activateur transcriptionnel qui intervient dans l'activation de nombreux gènes impliqués dans la détoxification (SOD) et dans la réparation de l'ADN (Storz and Imlay, 1999).

Le régulateur OxyR mis en évidence chez *E. coli* est responsable de la régulation de nombreux gènes codants pour des systèmes de détoxification (catalases, peroxydases, glutarédoxines *etc.*) (Christmann *et al.*, 1989). Cependant de nombreuses bactéries ne possèdent pas d'orthologues d'OxyR : c'est le cas des cyanobactéries.

Le régulateur négatif PerR (« peroxide repression ») contrôle la transcription de nombreux gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant (péroxyrédoxine, thiorédoxine) et dans l'homéostasie du fer (ferritine, régulateur Fur). Chez les cyanobactéries, seules des études sur *Synechocystis* ont confirmé l'implication du régulateur PerR dans la transmission du signal peroxyde (Li *et al.*, 2004), cependant la réponse au peroxyde semble faire intervenir des histidines kinases dont le mécanisme est peu connu et d'autres régulateurs qui restent inconnus.

Les protéines antioxydantes OhR sont retrouvées dans de nombreuses bactéries, cependant leur mécanisme n'est pas encore clair.

LE STRESS OXYDANT CHEZ LES CYANOBACTERIES

LES DOMMAGES SPECIFIQUES

Photo-inhibition

Lorsque les cyanobactéries sont exposées à de fortes intensités lumineuses, les centres réactionnels de la photosynthèse vont s'inactiver, c'est la photo-inhibition. Ce processus est dû à l'inhibition de la synthèse des protéines D1 du photosystème II par les ERO. En effet, les ERO sont capables de limiter le processus de traduction des protéines (Nishiyama *et al.*, 2001).

Dégradation des phycobilisomes

Les phycobilisomes sont indispensables à la photosynthèse chez les cyanobactéries, ils permettent de capter l'énergie lumineuse et la transférer au centre réactionnel. L'exposition de *Synechocystis* à un stress de type H₂O₂ conduit au désassemblage du phycobilisome et à l'interruption du transfert d'énergie de l'allophycocyanine à l'émetteur final (Liu *et al.*, 2005), ce qui montre que les phycobilisomes sont la cible des ERO.

LES DEFENSES

Les cyanobactéries font partie des premiers organismes à lutter contre le stress oxydant au niveau intracellulaire ; elles ont dû pour cela mettre en place des mécanismes de défense spécifiques contre le stress oxydant.

Dissipation de l'énergie

L'exposition à de fortes lumières va créer un stress oxydant sur les cellules photosynthétiques qui peut entraîner des dommages importants. Afin de prévenir ce risque, les organismes photosynthétiques vont dissiper l'énergie sous forme de chaleur. Chez les plantes, des antennes collectrices de lumière (Light Harvesting Complex) vont piéger le surplus d'énergie et la dissiper, ce qui se traduit par une diminution de la fluorescence émise par le PSII. Ce processus s'appelle le « quenching » non photochimique (NPQ) : il est déclenché par une acidification du lumen thylacoïdal qui résulte en la modification de la composition en caroténoïdes pour mieux capter l'énergie (Szabo *et al.*, 2005). Chez les cyanobactéries ce processus n'existe pas, pendant longtemps il était supposé qu'elles ne possédaient pas de système de photo-protection (**Figure 41**), mais certaines études récentes ont mis en évidence plusieurs mécanismes chez les cyanobactéries, en particulier chez *Synechocystis*.

Un des mécanismes de dissipation de l'énergie chez les cyanobactéries repose sur la protéine IsiA (ou CP43') dont l'expression est induite en carence en fer principalement, mais aussi dans des conditions de stress oxydant. Il a été montré qu'IsiA a un rôle à la fois de collecteur de lumière et de photoprotection. En effet, lors d'une carence en fer, IsiA va former un complexe autour du PSI qui va efficacement collecter l'énergie lumineuse, elle va également créer des agrégats solubles qui vont dissiper

l'énergie (Ihalainen *et al.*, 2005). Cependant, si les cellules sont soumises à une carence en fer en présence d'antioxydants, elles n'induisent plus la transcription d'*isiA*, ce qui montre que lors d'une carence en fer les cellules sont soumises à un stress oxydant et qu'*isiA* a un rôle de protection des photosystèmes contre le stress oxydant et en particulier contre les ERO (Lafiti *et al.*, 2005 ; Havaux *et al.*, 2005).

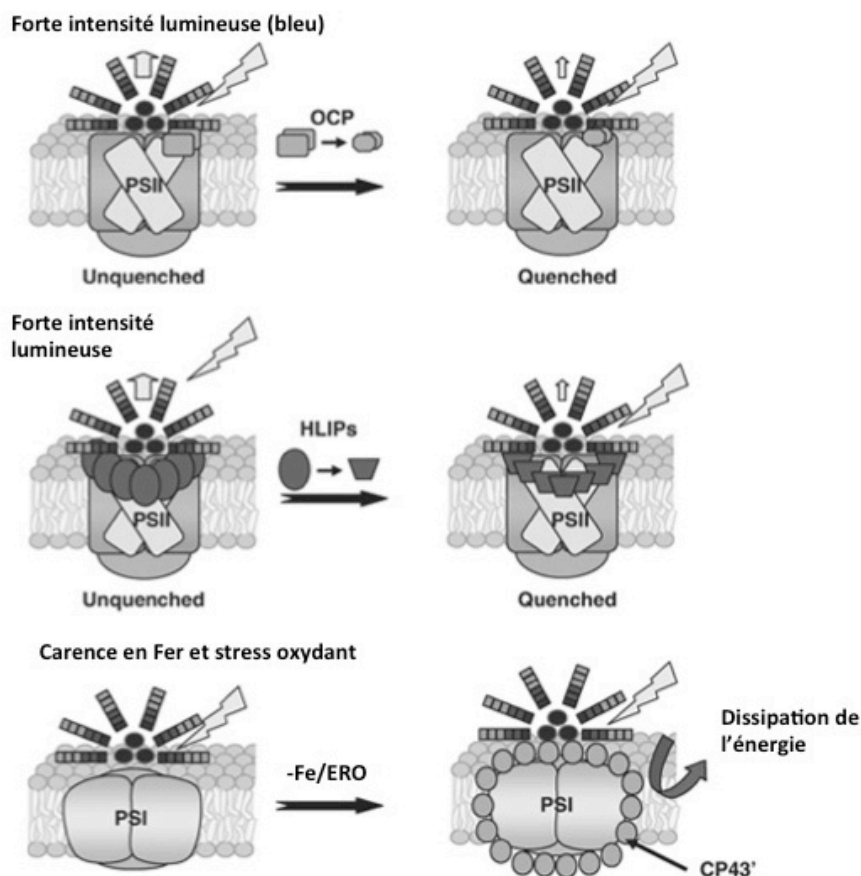


Figure 41 : Mécanisme de photo-protection contre le stress oxydant chez les cyanobactéries (d'après Lafiti *et al.*, 2008)

Il existe d'autres mécanismes de dissipation de l'énergie comme les « high-light-inducible proteins (HLIPs) » ou « CAB-like proteins » (SCPs) qui sont présentes sur les PSII ; elles jouent un rôle de photoprotection en dissipant l'énergie absorbée par le photosystème II par un changement conformationnel (He *et al.*, 2003).

Par ailleurs, certaines cyanobactéries peuvent également utiliser leur capacité de mobilité grâce à leur pili pour se déplacer selon un « photoaxis » négatif qui permet de s'éloigner de la forte lumière (Bhaya *et al.*, 2004).

Une autre protéine impliquée dans la dissipation de l'énergie chez les cyanobactéries est l'orange caroténoïde protéine (OCP) qui est présente chez de nombreuses cyanobactéries et déclenche un mécanisme de photo-protection (Kirilovsky and Kerfeld, 2012). Ce mécanisme est le suivant : dans des conditions de faible lumière, l'OCP est inactive de couleur orange et les phycobilisomes transfèrent presque toute

l'énergie absorbée aux photosystèmes. Mais lorsque les cellules sont exposées à de fortes intensités lumineuses, l'OCP est photo-convertie en une forme de couleur rouge qui interagit avec les phycobilisomes pour diminuer l'énergie qui arrive aux centres réactionnels, afin de les protéger (Wilson *et al.*, 2006). Une fois l'intensité lumineuse diminuée, la protéine « fluorescence Recovery Protéine » (FRP) va se lier à l'OCP rouge et va accélérer sa conversion en OCP orange (Boulay *et al.*, 2010).

Les antioxydants non enzymatiques

L'accumulation des ROS peut également être diminuée par des antioxydants non enzymatiques comme l' α -tocophérol (la vitamine E) qui est une molécule lipidique et organique soluble produite par les organismes photosynthétiques dont les cyanobactéries. La vitamine E peut être oxydée par les ERO pour former un radical tocopheryl et peut également convertir l'oxygène singulet en hydroperoxyde. Elle intervient comme protecteur dans de fortes conditions oxydantes, si on couple deux types de stress (ex : forte lumière et méthyl viologen). De plus, elle agirait dans la protection des membranes contre la peroxydation des lipides (Maeda *et al.*, 2005).

Les cyanobactéries possèdent une large variété de caroténoïdes indispensables pour capter l'énergie lumineuse lors de la photosynthèse. Ces pigments permettent également de dissiper l'énergie et possèdent des propriétés antioxydantes (β -carotène, zéaxanthine, myxoxanthophyll *ect.*). En effet, les caroténoïdes sont capables de détoxifier l'oxygène singulet produit par la photo-oxydation et peuvent également réagir avec les radicaux libres pour empêcher entre autre la peroxydation de lipides (Edge *et al.*, 1997).

CONCLUSION

Le domaine de connaissance du stress oxydant chez les cyanobactéries est en plein développement, la plupart des informations proviennent d'études chez les plantes mais l'étude de ces mécanismes chez les cyanobactéries peut ouvrir des portes à d'autres voies de protection du stress oxydant. En effet, comme décrite précédemment l'hydrogénase chez *Synechocystis* pourrait être une voie possible de détoxification du stress oxydant par le dégagement d'hydrogène gazeux dans des cellules.

RÉSULTATS

Article I

Résultats complémentaires de l'article I

Article II

Article III

Résultats Complémentaires de l'article II et III

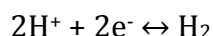
Article I

« Analysis of the photo-production machinery in *Synechocystis* »

OBJECTIF

Le développement d'organismes photosynthétiques capables d'utiliser l'énergie solaire pour produire du dihydrogène (H₂) passe par une meilleure compréhension du rôle de l'hydrogénase dans le métabolisme global des cyanobactéries.

L'hydrogénase (Hox) de *Synechocystis* est transcrite par l'opéron *hoxEFUYH* depuis un promoteur faible. Cet opéron code pour les 5 sous-unités protéiques (HoxEFUYH) contenant des centres rédox Ni-Fe et Fe-S qui catalysent la réaction réversible :



L'enzyme Hox est assemblée grâce au complexe Hyp qui comprend 6 protéines (HypABCDEF) codées par des gènes dispersés dans le génome de *Synechocystis* qui sont impliqués dans l'incorporation du site actif [NiFe] dans la sous-unité HoxH (Supplemental Fig. 1). Le rôle biologique de l'hydrogénase est mal connu, cependant différentes publications (Cournac *et al.*, 2004) suggèrent qu'elle serait une valve à électron pour évacuer le stress oxydant, et donc qu'elle serait impliquée dans la réponse au stress oxydant.

Cet article vise à mieux comprendre le rôle biologique de l'hydrogénase et à améliorer la production d'hydrogène chez la cyanobactérie modèle *Synechocystis*.

RESULTATS

1. L'opéron *hoxEFUYH* n'est pas nécessaire à la viabilité cellulaire

Pour comprendre le rôle de l'hydrogénase HoxEFUYH dans la physiologie de *Synechocystis*, un mutant Δ *hox* a été construit en remplaçant l'opéron *hox* par une cassette de résistance à la kanamycine (Fig. 1 ; Supplemental Fig. 5 panels A). Pour cela j'ai construit un plasmide (p Δ *hox*) avec une cassette de kanamycine bornée par les régions d'homologies amont et aval de l'opéron *hox* (Supplemental Fig. 3). Ce plasmide p Δ *hox* a été utilisé pour transformer une souche sauvage de *Synechocystis* et remplacer toutes les copies du chromosome par la cassette de résistance à la kanamycine (Supplemental Fig. 4).

Par Western Blot l'absence de la sous-unité HoxF ou HoxH a été vérifiée, ainsi que l'absence d'activité hydrogénase par la méthode d'électrode de Clark inversée (Supplemental Fig. 5 panels C et D). Ce mutant a permis de constater que la délétion de tout l'opéron *hox* n'affecte pas la croissance des cellules à 30°C et à 39°C, ce qui confirme que l'hydrogénase n'est pas essentielle à la viabilité cellulaire dans ces conditions (Supplemental Fig. 5 panel B).

2. La surexpression thermorégulée de l'opéron *hox* n'affecte pas la croissance cellulaire

Plusieurs études montrent que les gènes *hox* sont exprimés à partir d'un faible promoteur (Gutekunst et al., 2005; voir article II - Dutheil *et al.*, 2012). Pour mieux comprendre cette machinerie et améliorer la production d'hydrogène, j'ai construit un mutant de surexpression thermorégulé de l'opéron *hox* (TR1) (Fig. 1 ; Fig. 2 panel A). Expérimentalement, j'ai construit un plasmide pTR-*hox* à partir du plasmide pFCIK qui est un dérivé du plasmide pFCI (Chapitre Matériels et Méthodes ; Supplemental Fig. 2) en clonant les régions d'homologies du promoteur *hox*, de part et d'autre du système de thermorégulation contenant une cassette de résistance à la kanamycine et un promoteur fort (p_R) régulé par un répresseur thermosensible (cl_{857}) (Supplemental Fig. 6). Puis, la souche WT a été transformée avec le plasmide pTR-*hox* pour remplacer par recombinaison homologue, toutes les copies du promoteur faible naturel de l'opéron *hox* par un système d'expression thermorégulé (Supplemental Fig. 7).

Ce mutant n'est pas affecté dans sa croissance à 30°C lorsqu'il n'y a pas d'expression du système thermorégulé, ni à 39°C dans des conditions de surexpression des gènes *hox*, puisqu'il pousse aussi bien que le WT aux deux températures (Fig. 2 panel B). La surexpression des gènes *hox* (jusqu'à 26 fois) dans la souche TR1 comparée à la souche WT est confirmée par RT-PCR quantitative (Fig. 2 panel C). De plus on observe par Western Blot une augmentation importante des protéines Hox chez le mutant TR1 comparé à la souche WT (Fig. 2 panel D). Par ailleurs, le mutant TR1 présente une activité hydrogénase 1,5 fois plus importante que la souche WT dans les conditions standards de croissance (Fig. 2 panel E), ce qui montre qu'il y a un décalage entre l'abondance des transcrit *hox* et les protéines Hox par rapport au gain de l'activité hydrogénase. Ce résultat peut être dû à une quantité trop faible de nickel dans le milieu standard de croissance (qui ne possède que des traces de nickel) ou par un défaut du système de maturation qui lui n'est pas surexprimé, ou bien par une instabilité des protéines Hox ou du complexe à 39°C.

3. L'optimisation du milieu par ajout de nickel améliore l'activité hydrogénase

L'hydrogénase étant constituée d'un site catalytique [NiFe], on ajoute 2,5 μM de NiSO_4 dans le milieu de croissance (MM) et on augmente la teneur de fer (34 μM de $\text{Fe}(\text{N}_4)\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) (le milieu MM contenant 17 μM de fer) pour obtenir le milieu MM*. L'amélioration du milieu de culture permet d'obtenir une augmentation de l'activité hydrogénase pour la souche WT (d'un facteur 4) et mutante TR1 (d'un facteur 6) (Fig. 2 panel E), ce qui confirme que l'optimisation du milieu est un facteur limitant important pour avoir plus d'hydrogénase active et ainsi améliorer l'activité hydrogénase.

4. La surexpression thermorégulée des gènes *hox* et *hyp* permet d'augmenter l'activité hydrogénase

En parallèle, j'ai construit un mutant TR2 de surexpression thermorégulée des gènes *hox* et *hyp* pour augmenter l'activité hydrogénase (Fig. 1). Pour cela, j'ai construit un plasmide pTR-*hypA-F*, obtenu à la suite de 9 étapes de manière à rassembler les gènes *hyp* qui se trouvent éparpillés dans le génome de *Synechocystis* (Supplemental Fig. 1) en un opéron sous le contrôle du promoteur p_R régulé par le répresseur thermosensible cl_{857} . Ce plasmide pTR-*hypA-F* a été introduit par conjugaison dans le

mutant TR1 afin d'obtenir le mutant TR2 qui surexprime les gènes *hox* et *hyp* simultanément.

On observe qu'à 39°C, le mutant (TR2) qui surexprime l'opéron *hox* à partir du chromosome et les gènes *hyp* à partir du plasmide pTR-hypA-F présente une croissance similaire au sauvage (Fig. 3 panel A). Par RT-PCR quantitative on confirme la surexpression des gènes *hox* (jusqu'à 23 fois) et les gènes *hyp* (jusqu'à 130 fois) (Fig. 3 panel B). De plus, par Westernblot on remarque que la surexpression des gènes *hyp* augmente la quantité de la sous-unité HoxH qui contient le site catalytique [Ni-Fe] (Fig. 3 panel C). Cet effet peut être dû à une amélioration de la maturation du site catalytique par les protéines Hyp, ce qui entraîne une stabilisation de la sous-unité HoxH. Cette augmentation d'ARN et de protéine se traduit également par une augmentation de l'activité hydrogénase en MM et MM* qui permet d'obtenir une activité 13 fois supérieure chez le mutant TR2 en MM* comparé au sauvage en MM (Fig. 3 panel D).

5. La surexpression constitutive de l'opéron *hox* n'affecte pas la croissance cellulaire

Dans le mutant TR1 la surexpression des gènes *hox* n'est pas létale pour la croissance, cependant on ne sait pas si la répression des gènes *hox* par le répresseur cl₈₅₇ est totalement levée. Afin de s'affranchir de ce problème et du changement de température, un mutant de surexpression constitutive de l'opéron *hox* (CE1) a été également construit (Fig. 1). Pour cela un plasmide pCE-*hox* a été élaboré après digestion du plasmide pTR-*hox* par l'enzyme de restriction *PsiI* et ligation du plasmide, ce qui permet d'enlever le répresseur thermosensible cl₈₅₇ (Supplemental Fig. 11). Le plasmide a ensuite été utilisé pour transformer la souche WT de *Synechocystis* afin de remplacer le promoteur faible naturel de l'opéron *hox* par le promoteur fort (p_R), ce qui permet d'avoir une expression constitutive de l'opéron *hox* (Supplemental Fig. 12 ; Fig. 4 panel A).

Le mutant CE1 présente une croissance similaire au sauvage ainsi qu'une augmentation des transcrit *hox* et des protéines Hox, ce qui confirme que la surexpression des gènes *hox* n'affecte pas la croissance dans les conditions testées (Fig. 4 panel B, C et D). La quantité d'hydrogénase active dans le mutant CE1 est 14 fois plus importante dans le WT cultivée en présence de MM* (Ni+Fe).

6. La surexpression constitutive des gènes *hox* et *hyp* permet d'augmenter l'activité hydrogénase

Pour maximiser la production d'hydrogène dans le mutant CE1 et sachant que les protéines de maturation de l'hydrogénase étaient limitantes, j'ai introduit dans le mutant CE1 un plasmide qui permet la surexpression constitutive des gènes *hypABCDEF* (pCE-hypA-F) impliqués dans la maturation de l'hydrogénase j'ai ainsi obtenu le mutant CE2 (Fig. 1). Le plasmide pCE-hypA-F est obtenu après digestion du plasmide pTR-hypA-F par l'enzyme de restriction *PsiI* puis par religation, afin d'éliminer le répresseur thermosensible (cl₈₅₇), ce qui permet une expression constitutive des gènes *hypABCDEF* (Supplemental Fig. 13). La surexpression des gènes *hox* et *hyp* est confirmée par RT-PCR quantitative, de même que la surproduction des protéines Hox F et HoxH par Westernblot et HoxEFUYH par LC-MS/MS, dans le mutant CE2 comparé au WT (Fig. 5 panel B et C ; Tableau X). On observe une augmentation d'un facteur 17 de l'activité

hydrogénase du mutant CE2 en MM* comparée à l'activité de la souche WT en MM (Fig. 5 panel D). Ce mutant sera donc un bon châssis pour de futures manipulations afin d'ingénierer des souches dont la production d'hydrogène sera augmentée.

7. L'hydrogénase joue un rôle de protection contre le stress oxydant de type H₂O₂

Grâce à la construction de tous les mutants, nous avons cherché à mieux comprendre le rôle biologique de l'hydrogénase, notamment dans des conditions de stress oxydant. Pour cela, la tolérance de nos mutants confrontés à divers stress oxydants a été comparée à celle de la souche WT.

Comme décrit dans le chapitre IV, le H₂O₂ est une ERO qui peut causer des dommages dans les cellules comme la formation de méthionine-sulfoxyde toxique pour la cellule (Gilbert, 1990). De plus, par la réaction de Fenton elle peut créer des radicaux hydroxyles (HO·) et des anions hydroxydes (HO⁻) qui sont encore plus toxiques et peuvent entraîner la mort cellulaire.

Pour tester la tolérance des mutants à un stress oxydant, j'ai effectué des tests de survie en anaérobie (l'hydrogénase étant réversiblement inhibée par l'oxygène) de la souche WT, le mutant Δhox et le mutant CE1 exposés à des concentrations croissantes en H₂O₂ (Fig. 6 panel A). Les résultats montrent que la souche Δhox est plus sensible que la souche WT en présence d'H₂O₂, tandis que le mutant CE1 est plus tolérant. Ce qui indique que lorsque qu'il y a plus d'hydrogénase, *Synechocystis* devient plus sensible au H₂O₂, inversement lorsque la cellule exprime plus d'hydrogénase alors elle résiste mieux au stress oxydant causé par le H₂O₂. On peut donc constater que l'hydrogénase intervient dans la tolérance au stress oxydant.

Cependant, lorsque ces expériences ont été réalisées avec les souches portant pCE-hyp, on n'a pas observé une augmentation de survie à un traitement H₂O₂ mais l'effet contraire (Fig. 6 panel B). Les souches CE2 (souche qui surexprime les gènes *hox* et les gènes *hyp*) et CE3 (souche WT qui surexprime seulement les gènes *hyp*) présentent une tolérance plus faible que la souche WT, ce qui signale que la surexpression de tous les gènes *hyp* n'est pas bénéfique pour augmenter la tolérance au stress oxydant. Il est possible que la surexpression d'un ou plusieurs des gènes *hyp* ait un effet négatif sur la tolérance au stress oxydant de type H₂O₂ ou que les gènes *hyp* soient impliqués dans d'autres processus inconnus qui diminuent la tolérance au stress oxydant de type H₂O₂.

Ainsi les résultats suggèrent que l'hydrogénase permet d'augmenter la robustesse de cellules face à un stress oxydant de type H₂O₂ mais la surexpression de tous les gènes *hyp* ne favorise pas ce mécanisme.

8. L'hydrogénase joue un rôle de protection contre le stress oxydant de type glucose/glycerol

Des travaux récents du laboratoire (Narainsamy *et al.*, 2013) montrent que l'ajout de glucose provoque également du stress oxydant créant un surplus d'électrons qui interagit avec l'O₂ et par conséquent en produisant des ERO.

Pour tester le rôle de l'hydrogénase dans la tolérance au stress oxydant de type glucose ou glycérol, j'ai cultivé les mutants à de fortes lumières en présence de glucose

ou de glycérol (le glycérol étant un substrat peu coûteux et qui aurait les mêmes effets oxydants que le glucose).

Les résultats montrent que les mutants CE1 et CE2 ne sont presque pas affectés par le stress oxydant de type glucose ou glycérol, comparés à la souche sauvage et le mutant Δhox qui sont complètement altérés dans leur croissance (Fig. 7). D'autre part, on remarque que les mutants CE1 et CE2 ont des concentrations en cellules similaires et par conséquent que la surexpression des gènes *hyp* n'affecte pas la tolérance au glucose ou glycérol, mais ne l'augmente pas non plus. Ces données confirment que l'hydrogénase agit dans la tolérance au stress oxydant, et l'expression des gènes *hyp* modifie la réponse en fonction la nature du stress oxydant.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Pour la photoproduction d'hydrogène par voie biologique, on envisage à terme, d'utiliser les cyanobactéries qui effectuent à la fois la photosynthèse et la production d'hydrogène, grâce à leurs enzymes hydrogénases. Cependant, la machinerie cellulaire de production de l'hydrogène est mal connue, peu abondante et peu active dans les conditions normales de croissance photo-autotrophique. Pour espérer l'améliorer il est nécessaire de l'étudier de façon approfondie, notamment par les différentes approches de biologie intégrative qui devraient nous permettre de mieux comprendre la place et le rôle de la production d'hydrogène dans la physiologie et le métabolisme cyanobactérien.

Les résultats exposés dans cet article qui sont soumis à « Metabolic Engineering », démontrent que l'on doit combiner plusieurs stratégies génétiques et physiologiques pour augmenter jusqu'à 17 fois la production d'hydrogène chez *Synechocystis* (Fig. 5 panel D). De plus, on a démontré que l'hydrogénase bidirectionnelle de *Synechocystis* agit comme une protection contre le stress oxydant et que les gènes *hyp* ne semblent pas être impliqués dans cette tolérance (Fig. 6 et 7). Pour compléter le rôle de l'hydrogénase dans l'évacuation du stress oxydant, il serait pertinent de tester la tolérance à d'autres stress oxydant, ou voir même d'autres stress, comme un stress métallique.

Dans cet article on a démontré que la surexpression des gènes *hoxEFUYH* codant pour l'hydrogénase simultanément aux gènes *hypABCDEF* impliqués dans l'insertion du site catalytique [NiFe] (Tamagnini *et al.*, 2007 ; Supplemental Fig. 1) permet d'augmenter la quantité d'hydrogénase active (Fig. 3 panel D ; Fig. 5 panel D). Cependant la maturation de l'hydrogénase fait également intervenir un gène codant pour la protéase HoxW qui clive la sous-unité HoxH pour finir sa maturation (Supplemental Fig. 1). Afin de maximiser la production d'hydrogène chez *Synechocystis*, il serait intéressant de surexprimer également le gène *hoxW* et d'analyser ce mutant dans différentes conditions expérimentales.

Engineering *Synechocystis* PCC6803 for hydrogen production: influence on the tolerance to oxidative and sugar stresses

Marcia Ortega-Ramos^a, Thichakorn Jittawuttipoka^a, Panatda Saenkham^a, Aurelia Czamecka-Kwasiborski^a, Hervé Bottin^b, Corinne Cassier-Chauvat^{1,a} and Franck Chauvat^{1,a,*}

^a UMR8221, CEA, CNRS, Université Paris Sud, iBiTec-S, LBBC, Bat 142 CEA-Saclay, F-91191 Gif sur Yvette CEDEX, France

^b UMR8221, CEA, CNRS, Université Paris Sud, iBiTec-S, LMB, Bat 532 CEA-Saclay, F-91191 Gif sur Yvette CEDEX, France

¹: These authors contributed equally to this work

* Corresponding author. UMR8221, CEA, CNRS, Université Paris Sud, iBiTec-S, LBBC, Bat. 142 CEA-Saclay, F-91191 Gif sur Yvette CEDEX, France. Tel. 33 (0) 1 69 08 35 74; Fax: 33 (0) 1 69 08 80 46

Email address: franck.chauvat@cea.fr

Abstract

In the prospect of engineering cyanobacteria for the biological photoproduction of hydrogen, we have studied the hydrogen production machine in the model unicellular strain *Synechocystis* PCC6803 through gene deletion, and overexpression (constitutive or controlled by the growth temperature). We demonstrate that the hydrogenase-encoding *hoxEFUYH* operon is dispensable to standard photoautotrophic growth in absence of stress, and it operates in cell defense against oxidative (H₂O₂) and sugar (glucose and glycerol) stresses. Furthermore we showed that the simultaneous over-production of the proteins HoxEFUYH and HypABCDE (assembly of hydrogenase), combined to an increase in nickel availability led to an approximately 20-fold increase in hydrogenase activity.

Highlights

Combining overproduction of the Hox and Hyp proteins increases hydrogenase activity

The hydrogenase encoding *hoxEFUYH* operon operates in the protection against H₂O₂

The cyanobacterial *hoxEFUYH* operon operates in the tolerance to glucose and glycerol

1. Introduction

Cyanobacteria are the only known prokaryotes capable of oxygenic photosynthesis, which uses nature's most abundant resources, solar energy, water, CO₂ and mineral nutrients, to produce a large part of the oxygen and organic assimilates for the aerobic food chain. Furthermore, cyanobacteria are regarded as promising “low-cost” microbial cell factories for carbon capture and storage, and the sustainable production of biofuels, thanks to their simple nutritional requirements; their physiological robustness (in colonizing a wealth of biotopes they will enable future industrial productions to be performed near the sites of use, to reduce transportation costs); and the powerful genetics of some model strains. One of the fuels of special interest is hydrogen (H₂) because it is a high-energy fuel (Maeda et al., 2008) that burns cleanly in producing only water as its by-product. Thus, it is important to investigate the cyanobacterial machine for the production of hydrogen. The complex cyanobacterial machine for hydrogen production (supplementary Fig. S1) is best studied in the widely used unicellular strain *Synechocystis* PCC6803 (Eckert et al., 2012) (hereafter designated as *Synechocystis*), which harbours a small genome (less than 4 Mb; See CyanoBase:

<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/>) easily manipulable (Ferino and Chauvat, 1989; Grigorieva and Shestakov, 1982; Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994; Poncelet et al., 1998). The pentameric hydrogenase enzyme (HoxEFUYH; Hox for hydrogen oxidation), which is reversibly inactivated by oxygen (Cournac et al., 2004), is a bidirectional enzyme with a bias to H₂ production (McIntosh et al., 2011). This reaction, $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$, uses NAD(P)H as the source of electrons originating from photosynthesis and/or sugar catabolism, and a nickel-iron center and several iron-sulfur clusters as redox cofactors (Carrieri et al., 2011). The five *Synechocystis* genes *hoxEFUYH* are clustered in an octacistronic operon that comprises the following genes *hoxE*, *hoxF*, *sll1222*, *hoxU*, *hoxY*, *ssl2420*, *sll1225* and *hoxH* in that order, which also encode the three proteins of unknown function Sll1222, Ssl2420 and Sll1225 (Carrieri et al., 2011; Eckert et al., 2012). The *hoxEFUYH* operon is expressed by a weak promoter (Dutheil et al., 2012), which generates a polycistronic transcript that initiates 168 bp upstream of the start codon of the proximal *hoxE* gene (Gutekunst et al., 2005; Oliveira and Lindblad, 2005). The HoxEFU subunits make up the diaphorase sub-complex that transfers the electrons provided by NAD(P)H (Cournac et al., 2004) to the hydrogenase unit HoxHY that reduces the protons to generate H₂ (supplementary Fig. S1). After HoxYH assembly, the HoxH subunit is processed by the HoxW protease (Eckert et al., 2012). The Hox complex is assembled by the six-subunits HypABCDE complex enzyme (Carrieri et al., 2011; Eckert et al., 2012) encoded by the *hypABCDE* genes, which are scattered onto the chromosome (supplementary Fig. S1). Physiological studies indicated that the hydrogenase enzyme acts as an emergency electron valve to release excess of photosynthetic electrons, for instance during the transition from (anaerobic) dark to light conditions, leading to weak and transient H₂ production (Carrieri et al., 2011; Cournac et al., 2004).

To attempt increasing hydrogenase activity in *Synechocystis* Germer and co-workers have used the light-inducible promoter of the photosynthetic gene *psbAII* to increase the expression of the endogenous *hoxEFUYH* operon and the heterologous *Nos**hypABCDE* operon from *Nostoc* PCC7120 (Germer et al., 2009). The gain in activity was modest (3.2 fold; *i.e.* from 2.9 nmol H₂.min⁻¹.μg chlorophyll⁻¹ in wild-type cells up to 9.4 nmol H₂.min⁻¹.μg chlorophyll⁻¹ in mutant cells) for the following possible reasons. First, the light-inducible *psbAII* promoter used to increase the expression of the *hoxEFUYH* and the *Nos**hypABCDE* genes is more active under high light, which increases the photosynthetic production of O₂, which inhibits hydrogenase activity. Second, the C-terminus of the HoxF subunit was fused to the strep tag, which might have interfered with HoxF activity. Third, the Km^r marker gene that was introduced downstream of the strep-tagged *hoxF* gene might have decreased the expression of the downstream genes *hoxUYH*, at least in increasing the spacing distance between them and the *psbAII* promoter. Fourth, it is also possible that the *Nostoc* HypABCDE proteins are not fully active on the *Synechocystis* PCC6803 HoxEFUYH proteins, or could somehow interfere with hydrogen production (for instance interfere with the function of the endogenous *Synechocystis* HypABCDE proteins). Fifth, the *Nos**hypABCDE* operon contains a gene, *asr0697* (located between *hypD* and *hypE* (Agervald et al., 2008)) encoding a protein (a putative 4-oxalocrotonate tautomerase), which is not normally present in *Synechocystis* and could interfere with hydrogen metabolism. For the same objective of increasing the hydrogenase activity we have characterized and deleted the *Synechocystis* AbrB2 repressor of the *hoxEFUYH* operon (Dutheil et al., 2012; Sakr et al., 2013) with little success (two fold increase of hydrogenase activity as compared to the wild-type strain).

In spite of these studies, the role of the hydrogen metabolism remains puzzling. A better understanding of this role is required to identify suitable environmental conditions and powerful genetic manipulations to improve the level of hydrogen production. In this prospect, we have studied the hydrogen production machine in the model unicellular strain *Synechocystis* PCC6803 through gene deletion, and overexpression (constitutive or controlled

by the growth temperature). We report that the hydrogenase-encoding *hoxEFUYH* operon is dispensable to standard photoautotrophic growth in absence of stress, and it operates in cell defense against oxidative (H₂O₂) and sugar (glucose and glycerol) stresses. Furthermore, we show that the simultaneous over-production of the endogenous proteins HoxEFUYH and HypABCDEF, combined to an increase in nickel availability led to an approximately 20-fold increase in hydrogenase activity.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and culture conditions

Synechocystis PCC6803 was grown at 30°C or 39°C (depending on the experiments) under continuous white light (standard intensity is 2,500 lux; 31.25 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) on mineral medium (MM), *i.e.* BG11 enriched with 3.78 mM Na₂CO₃ (Domain et al., 2004). Some cultures were performed in MM supplemented with 16 μM (Fe(NH₄)C₆H₅)O₇) and 2.5 μM NiSO₄, for hydrogenase assay, or with 10 mM glucose or 300 μM glycerol, as indicated. For survival analyses, exponentially growing cells were harvested at the density of $2.5 \times 10^7 \text{ cells.ml}^{-1}$, washed and resuspended in MM at the same concentration. Then, 1 ml aliquotes were incubated for 1 h under anaerobiose with H₂O₂ at the indicated concentrations. Cells were washed and resuspended in an equal volume of MM, diluted, spread on MM solidified with 1% agar (difco) and subsequently incubated at 30°C under standard light. Surviving colonies were counted after 5-7 days of growth.

E. coli strains used for gene manipulations (TOP10; Invitrogen® or DH5 α for conjugative transfer to *Synechocystis* (CM404) of replicative plasmids (Table 1) derived from pFC1 (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994) were grown on LB medium at 30°C (CM404 and TOP10 harbouring pFC1 derivatives) or 37°C (TOP10, DH5 α). Antibiotic selection was as follows: ampicillin (Ap) 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, kanamycin (Km) 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, and spectinomycin (Sp) 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ for *E. coli*; Km 50-300 mg.ml^{-1} , Sp 2.5-5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ and streptomycin (Sm) 2.5-5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ for *Synechocystis*.

2.2. Construction of pFC1K, the Km^r replicative plasmid vector for temperature-controlled gene expression in *Synechocystis*

pFC1K (supplementary Table S1) was constructed (supplementary Fig. S2) using the vector pFC1, which possesses the λCI_{857} - λp_R system for temperature-regulated gene expression and replicates autonomously in *E. coli* and cyanobacteria (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994). The λCI_{857} temperature sensitive repressor-encoding gene tightly controls the activity of the otherwise strong λp_R promoter that is followed by the λcro ribosome-binding site (5'-AGGA-3') and ATG start codon embedded within the unique *Nde* I restriction site (5'-CATATG-3') for in frame-fusion of the protein coding region of the studied genes (Dutheil et al., 2012; Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994). The Km^r gene was PCR amplified from the commercial pUC4K plasmid (supplementary Table S1) with the oligonucleotide primers KmHinCFW and KmHinCRV (supplementary Table S2), which introduced a flanking *Hinc* II restriction site. After *Hinc* II cleavage, the Km^r gene was cloned in place of the Sm^r/Sp^r marker of pFC1 opened with *Nae*I and *Xmn*I, yielding pFC1K which was verified by PCR and nucleotide sequencing (Big Dye kit, ABI Perking Elmer).

2.3. RNA isolation and analysis

200 ml of mid-log phase cultures ($2.5 \times 10^7 \text{ cells ml}^{-1}$) were rapidly harvested by vacuum filtration (less than 1 min); resuspended in 4 ml Tris 50 mM pH8, EDTA 5 mM; immediately frozen in an Eaton press chamber cooled in a dry ice and ethanol bath and

disrupted (250 MPa). RNA were extracted and purified with the Qiagen kit RNAeasy as we described (Dutheil et al., 2012; Leplat et al., 2013). RNA concentration and purity ($A_{260}/A_{280} > 1.9$) were determined with a Nanodrop (Thermo scientific) and migration on agarose gel to verify the absence of RNA degradation. The absence of contaminant DNA was verified with the *Taq* DNA-dependent DNA-Polymerase (Invitrogen) using primers specific to the control gene *rnpB* (supplementary Table S2). For quantitative RT-PCR the gene specific primers were chosen so as to generate DNA fragment of similar length comprised between 163 bp and 234 bp. Each assay was triplicated, allowing the mean threshold cycle value (C_T) to be calculated from standard curve by the iQ5 optical system software (BioRad). Each gene-specific standard curve was made by 4 fold serial dilution of wild-type strain cDNA (ranging from 9375 to 9.16 ng) against log input cDNA concentration for each primer (data not shown). For each primer tested, the regression value (DC_T versus cDNA concentration) was less than 0.1, indicating approximately equal amplification efficiencies. Then, for each studied gene the C_T value was converted to gene copy number per ng of template cDNA.

2.5. Western blot analysis of the *HoxF* and *HoxH* proteins

40 μ g of *Synechocystis* proteins separated on 12% SDS PAGE (Thermo scientific) were transferred (iBlot system; Invitrogen) to nitrocellulose membrane (Invitrogen), which were blocked for 1 h at room temperature or overnight at 4 °C with 5% non-fat milk in phosphate buffered saline (PBS). Immunodetection was performed using the following rabbit antibodies (Aubert-Jousset et al., 2011) anti-*HoxF* (dilution 1:2000) and anti-*HoxH* (dilution of 1:500). R800 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) were used as secondary antibodies (dilution of 1:1000), and immune complexes were visualized by chemiluminescence (ECL from GE Healthcare Amersham).

2.5. Proteomics experiments

LC-MS/MS analysis and identification of the *HoxEFUYH* and *HypABCDEF* proteins were performed on the PAPPSPPO platform (<http://pappso.inra.fr/index.php?lang=en>), using QExactive mass spectrometer (ThermoFinnigan) and/or a LTQ-Orbitrap Discovery (ORBITRAP Discovery; ThermoFinnigan).

2.6. Hydrogenase activity measurements

Hydrogenase activities were measured on 1 ml aliquots of mid-log phase culture concentrated 5.7-fold by centrifugation, using a modified Clark-type electrode (Hansatech, UK), and Na-dithionite and 5 mM methylviologen as the electron donor to hydrogenase, as we previously described (Dutheil et al., 2012).

3. Results

3.1. The *hoxEFUYH* operon is dispensable to the photoautotrophic growth of *Synechocystis*

To investigate the role of the octacistrionic *hoxEFUYH* operon on the physiology of *Synechocystis*, we constructed a $\Delta hoxEFUYH::Km^r$ deletion mutant (Fig. 1) by replacing the whole *hoxEFUYH* operon (from 58 bp upstream of the ATG start codon of *hoxE* to 8 bp downstream of the stop codon TAA of *hoxH*) by a Km^r marker gene (supplementary Fig. S3). Therefore, the Km^r gene was amplified from the pFC1K plasmid constructed in this study (supplementary Fig. S2 and supplementary Table S1), using specific oligonucleotide PCR primers (supplementary Table S2) that generated *SphI* and *AflIII* restriction sites for cloning into pGEM-T (supplementary Fig. S3). Meanwhile, the two regions of *Synechocystis* DNA (about 300 bp each) flanking the *hoxEFUYH* operon were independently amplified with PCR primers (supplementary Table S2) that generated *SphI* or *AflIII* restriction sites (supplementary

Fig. S3). After cleavage, these *Synechocystis* DNA segments were cloned on each side of the Km^r marker of the pGEM-T derivative to serve as platforms for homologous recombinations promoting targeted gene replacement (Labarre et al., 1989) (*i.e.* replacement of the *hoxEFUYH* operon by the Km^r gene) upon transformation. The resulting $\Delta hoxEFUYH::Km^r$ DNA cassette (supplementary Fig. S3) was verified by PCR and nucleotide sequencing, prior to transformation to *Synechocystis* (Labarre et al., 1989). Km^r mutants were analyzed by PCR (supplementary Fig. S4) to verify that the Km^r marker had properly replaced the whole *hoxEFUYH* operon (from 71 bp upstream the *hoxE* ATG start codon to 19 bp after the *hoxH* TAA stop codon) in all copies of the chromosome, which is polyploid (Labarre et al., 1989). The absence of the *hoxEFUYH* operon in the $\Delta hoxEFUYH::Km^r$ mutant was confirmed upon the analysis of culture grown for a few generations in absence of Km to stop counter-selecting the propagation of possibly remaining wild-type (WT) chromosome copies, prior to the PCR assays (supplementary Fig. S4). We also confirmed through quantitative RT-PCR that the $\Delta hoxEFUYH::Km^r$ mutant completely lacks *hoxEFUYH* transcripts (data not shown), as well as the HoxF and HoxH proteins and hydrogenase activity (supplementary Fig. S5). These data, together with the fact that the $\Delta hoxEFUYH::Km^r$ mutant grows as healthy as the WT strain under standard photoautotrophic conditions (supplementary Fig. S5), showed that the *hoxEFUYH* operon is dispensable in *Synechocystis*. This finding is consistent with the previously observed dispensability of the *Synechocystis hoxHY* genes in the otherwise WT strain (Pinto et al., 2012), and the *hoxEFUYH* operon in the glucose tolerant mutant (Eckert et al., 2012).

3.2. Construction and analysis of a mutant for temperature-controlled high-level expression of the *hoxEFUYH* operon: replacement of its weak promoter by the strong promoter λp_R controlled by the temperature-sensitive repressor λcI_{857}

To increase the expression of the *hoxEFUYH* operon, while caring with the possibility that above a certain level it might become toxic, we decided to replace the weak promoter of the *hoxEFUYH* operon (Dutheil et al., 2012) by a strong and controllable promoter. Therefore, we used the $\lambda cI_{857}-\lambda p_R$ system that expresses genes proportionally to the temperature of growth (Ferino and Chauvat, 1989; Marteyn et al., 2013; Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994): *i.e.* absence of expression at 30°C (the standard growth temperature) and strong expression at 39°C (good growth of wild-type cells). Practically, the 2.8 kb $Km^r-\lambda cI_{857}-\lambda p_R$ DNA cassette of the pFC1K plasmid presently constructed (supplementary Fig. S2) was amplified by PCR amplified, and introduced in place of the *hoxEFUYH* operon promoter (the 691 bp region upstream of the ATG start codon of *hoxE*), as follows (supplementary Fig. S6). The 252 bp region of *Synechocystis* DNA upstream of the *hoxEFUYH* operon promoter was amplified by PCR with specific oligonucleotide primers (supplementary Table S2), digested with the *Bam*HI and *Sph*I and cloned upstream of the Km^r marker of pFC1K opened with the same enzymes. Meanwhile, the 527 bp region of *Synechocystis* DNA encompassing the *hoxE* coding sequence was cloned as a *Nde*I-*Eco*RI DNA segment downstream of the λp_R -promoter of pFC1K opened with the same enzymes. The resulting pTR-*hoxEFUYH* plasmid was linearized with *Eco*RV and transformed to *Synechocystis*, where homologous recombinations introduced the $Km^r-\lambda cI_{857}-\lambda p_R$ DNA cassette in place of the natural promoter of the *hoxEFUYH* operon. Km^r transformant clones growing in standard conditions were analyzed by PCR (supplementary Fig. S7) to verify that the $Km^r-\lambda cI_{857}-\lambda p_R$ DNA cassette had properly replaced the natural *hoxEFUYH* operon promoter, in all copies of the polyploid chromosome. We verified that this mutant, hereafter designated as TR-*hoxEFUYH* (Fig. 1), possessed no wild-type (WT) chromosome copies, even when cells were grown in absence of Km that otherwise counter-select the propagation of WT chromosome copies (supplementary Fig. S7).

The TR-*hoxEFUYH* mutant strain grew as fit as the WT strain at both 30°C and 39°C (Fig. 2). Then, we verified through quantitative RT-PCR analysis that the λ CI₈₅₇- λ p_R promoter system expressed the TR-*hoxEFUYH* operon in a true temperature-controlled way. Therefore, total RNAs isolated from the TR-*hoxEFUYH* mutant and WT strains grown at either 30°C or 39°C were hybridized with specific RT-PCR primers (supplementary Table S2) designed to amplify an internal segment of each eight genes of the *hoxEFUYH* operon (*hoxE*, *hoxF*, *sll1222*, *hoxU*, *hoxY*, *sll12420*, *sll1225* and *hoxH*; Fig. 1). The abundance of all eight transcripts were similar in WT cells grown at 30°C (the standard temperature) or 39°C (Fig. 2), showing that the expression of the WT-*hoxEFUYH* operon from its natural promoter is not affected by these temperatures. By contrast, all eight *hoxEFUYH* mRNAs were much more abundant in TR-*hoxEFUYH* cells grown at 39°C as compared to 30°C, in agreement with our previous reports that at 30°C the λ CI₈₅₇ repressor strongly inhibits the activity of the λ p_R promoter (Ferino and Chauvat, 1989; Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994). Furthermore, at 39°C the *hoxEFUYH* transcript levels were higher in the TR-*hoxEFUYH* mutant than in the WT strain (Fig. 2). Consistently, the abundance of the HoxF and HoxH proteins were higher in TR-*hoxEFUYH* cells grown at 39°C as compared to 30°C, or to WT cells grown either at 30°C or 39°C (Fig. 2).

Collectively, these data demonstrated that the *hoxEFUYH* operon is expressed in a temperature-controlled way in the TR-*hoxEFUYH* mutant, and that the overexpression of the *hoxEFUYH* operon at 39°C is not detrimental to cell life. However, the 39°C-induction of the hydrogenase activity in the TR-*hoxEFUYH* mutant was modest in comparison to the strong induction of the *hoxEFUYH* transcripts or HoxF and HoxH proteins (Fig. 2). As the activity of the Ni-Fe hydrogenase can be limited by the availability of Fe and/or Ni atoms (Carrieri et al., 2008; Gutekunst et al., 2006), we have also measured the hydrogenase activity in cells grown at either 30°C or 39°C in standard medium (MM) with or without the addition of both Fe (16 μ M) and Ni (2.5 μ M). The data showed that, together, the overexpression of the *hoxEFUYH* operon and the increased Ni- and Fe-availabilities led to an eight-fold higher hydrogenase activity (Fig. 2). Though significant the gain in hydrogenase activity remained lower than what was expected from the strong accumulation of *hoxEFUYH* transcripts and HoxF and HoxH proteins, suggesting that other limiting factors exist such as the abundance of the hypABCDEF proteins involved in assembly of the pentameric HoxEFUYH hydrogenase enzyme complex (Carrieri et al., 2011; Eckert et al., 2012).

3.3. Construction and analysis of a mutant for concomitant temperature-controlled overexpression of the *hoxEFUYH* operon and *hypABCDEF* genes in *Synechocystis*

To increase the formation of active hydrogenase enzymes, we decided to construct a mutant for temperature-controlled high-level expression of not only the *hoxEFUYH* operon but also all six genes *hypABCDEF* within the same cells (Fig. 1). Therefore, the scattered *Synechocystis* *hypABCDEF* genes (supplementary Fig. S1) were cloned in that order in our replicative plasmid vector pFC1 (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994), under the control of the above mentioned λ CI₈₅₇- λ p_R system for tight temperature-controlled expression (supplementary Fig. S8). First, the *hypA1* and *hypB1* genes were PCR amplified from *Synechocystis* DNA (see supplementary Table S2 for the primers), and joined through standard PCR-driven overlap extension (Heckman and Pease, 2007) in a single DNA molecule flanked by a *Nde*I restriction site encompassing the ATG start codon of *hypA1* and a *Sal*I site downstream of the *hypB1* stop codon. After cleavage with both *Nde*I and *Sal*I, the *hypA1-hypB1* cassette was cloned in pFC1 opened with the same enzymes, yielding the pTR-*hypAB* plasmid. Then, the *hypC*, *hypD* and *hypE* genes were PCR amplified from *Synechocystis* DNA, joined in that order in a single DNA molecule, and cloned as a *Sal*I and *Bsp*el restriction DNA fragment in pTR-*hypAB* opened with the same enzymes. The resulting

plasmid pTR-*hypABCDE* was opened with *BspEI* to clone the *BspEI* restriction fragment harboring the *hypF* gene generated by PCR, yielding the plasmid pTR-*hypABCDEF* (supplementary Fig. S8). The structure of the pTR-*hypABCDEF* plasmid was verified by PCR analyses (supplementary Fig. S9) and DNA sequencing of the λ cI₈₅₇- λ p_R cassette and all cloning junctions. Then pTR-*hypABCDEF* was introduced by conjugation (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994) into the above-mentioned TR-*hoxEFUYH* mutant over-expressing the chromosomal *hoxEFUYH* operon in a temperature-regulated way. This yielded the Km^r-Sm^r/Sp^r mutant hereafter referred to as TR-*hoxEFUYH-hypABCDEF*, which also carried the WT alleles of the *hypABCDEF* genes in its chromosome (Fig. 1). The TR-*hoxEFUYH-hypABCDEF* cells (abbreviated as TR2) grew as fit as the wild-type strain (WT) at 30°C or 39°C (Fig. 3 and supplementary Fig. S10). Then, we verified through quantitative RT-PCR that this mutant strongly expressed the *hoxEFUYH* and *hypABCDEF* genes in a temperature-controlled way, thanks to the λ cI₈₅₇ and λ p_R devices. Indeed, the abundance of the *hoxEFUYH* and *hypABCDEF* transcripts was much higher in TR-*hoxEFUYH-hypABCDEF* cells grown at 39°C than at 30°C, or as compared to WT cells grown at 30°C or 39°C. Consistently, the HoxF and HoxH proteins were much more abundant in TR-*hoxEFUYH-hypABCDEF* cells grown at 39°C, than at 30°C, or as compared to WT cells grown at either 30°C or 39°C (Fig 3). Furthermore, the hydrogenase activity of the TR-*hoxEFUYH-hypABCDEF* mutant was higher in cells cultivated at 39°C as compared to 30°C, or to WT cells grown at 30°C or 39°C (supplementary Fig. S10). Moreover the gain of hydrogenase activity observed at 39°C was significantly higher in the TR-*hoxEFUYH-hypABCDEF* mutant, which overexpresses the *hoxEFUYH* operon and the *hypABCDEF* genes, than in the above-mentioned TR-*hoxEFUYH* mutant, which overexpresses only the *hoxEFUYH* operon (Fig. 3). This finding is consistent with the role of the HypABCDEF in assembling a functional HoxEFUYH hydrogenase complex (Carrieri et al., 2011; Eckert et al., 2012). Collectively, our data demonstrated that the strong, temperature-controlled, expression of *hoxEFUYH* operon and the *hypABCDEF* genes are not detrimental to cell life. Again, the 13-fold increase of hydrogenase activity observed in the TR-*hoxEFUYH-hypABCDEF* mutant cultivated at 39°C in the presence of additional Fe and Ni that positively influence hydrogenase activity was lower than the strong accumulation of the *hoxEFUYH* transcripts or HoxF and HoxH proteins (Fig. 3 and supplementary Fig. S10).

3.4. Construction and analysis of a mutant for strong constitutive expression of the *hoxEFUYH* operon and *hypABCDEF* genes in *Synechocystis*

The present finding that the concomitant high-level expression of the *hoxEFUYH* and *hypABCDEF* genes was not toxic to the temperature-controlled mutant (TR-*hoxEFUYH-hypABCDEF*) growing at 39°C, prompted us to attempt further increasing it in a constitutive way as a step towards the engineering of a powerful strain for hydrogen production as well as to facilitate the comparative analysis of such a mutant with the WT and our Δ *hoxEFUYH* mutant (Δ *hoxEFUYH*::Km^r). Therefore, the plasmids pTR-*hoxEFUYH* and pTR-*hypABCDEF* were deleted of most of the λ cI₈₅₇ gene encoding the temperature-sensitive repressor because it is not totally inactivated at 39°C (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994) and *Synechocystis* grows poorly at higher temperatures. Practically, the pTR-*hoxEFUYH* and pTR-*hypABCDEF* plasmids were cleaved with the restriction enzyme *PsiI* to delete (517 bp) the λ cI₈₅₇ repressor gene yielding the pCE-*hoxEFUYH* and pCE-*hypABCDEF* plasmids (CE for constitutive expression). The pCE-*hoxEFUYH* plasmid (supplementary Fig. S11) was linearized with *EcoRV* and transformed to *Synechocystis*, where homologous recombinations introduced the Km^r- λ p_R DNA cassette in place of the weak (Dutheil et al., 2012) *hoxEFUYH* operon promoter, in all copies of the polyploid (Labarre et al., 1989) chromosome (supplementary Fig. S12). This Km^r CE-*hoxEFUYH* mutant grew as fit as the WT strain in standard (30°C)

photoautotrophic conditions (Fig. 4). Then, we verified through quantitative RT-PCR that this mutant strongly expressed all eight genes of the *hoxEFUYH* operon, thanks to the λp_R promoter, and accumulated the HoxF and HoxH proteins (Fig. 4). Consistently, the hydrogenase activity of the CE-*hoxEFUYH* mutant was higher than that of the WT strain (Fig. 4). Together, the constitutive overexpression of the *hoxEFUYH* operon and the increased Ni- and Fe-availabilities led to a fourteenth-fold higher hydrogenase activity (Fig. 4), i.e. a higher increase than the eight-fold value observed after heat induction of the temperature-controlled TR-*hoxEFUYH* mutant (Fig. 2).

To increase the formation of active hydrogenase enzymes, we introduced the above-mentioned pCE-*hypABCDEF* plasmid (Sm^r/Sp^r ; supplementary Fig. S13) by conjugation (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994) into the CE-*hoxEFUYH* mutant. This yielded the Km^r - Sm^r/Sp^r mutant hereafter referred to as CE-*hoxEFUYH-hypABCDEF*, which also carried the WT alleles of the *hypABCDEF* genes in its chromosome (Fig. 1). This CE-*hoxEFUYH-hypABCDEF* mutant grew as fit as the WT strain and the CE-*hoxEFUYH* mutant in standard (30°C) photoautotrophic conditions (Fig. 5). As expected, the CE-*hoxEFUYH-hypABCDEF* mutant strongly expressed the *hoxEFUYH* operon and the *hypABCDEF* genes accumulated the corresponding proteins (Fig. 5; and supplementary Table. S3). Furthermore, the hydrogenase activity of the CE-*hoxEFUYH-hypABCDEF* mutant was higher than those of the CE-*hoxEFUYH* mutant and the WT strain in that order (Fig. 5). Together, the constitutive overexpression of the *hoxEFUYH* operon and the *hypABCDEF* genes, and the increased Ni- and Fe-availabilities led to a seventeenth-fold increase in hydrogenase activity as compared to WT cells cultivated in absence of Fe and Ni supplementation (Fig. 5). We think this strain with an increased hydrogenase activity is a suitable chassis for future gene manipulations required to engineer a powerful hydrogen producer.

3.6. The *hoxEFUYH* operon, but not the *hypABCDEF* genes, operates in the protection against hydrogen peroxide

All aerobic organisms invariably produce reactive oxygen species, such as O_2^- (superoxide anion) and H_2O_2 through the accidental autoxidation of redox enzymes (Imlay, 2013), which occurs when their reduced cofactors accidentally reduces oxygen. This phenomenon is frequent in cyanobacteria, where their active photosynthesis massively produces oxygen and often generates an excess of electrons (Narainsamy et al., 2013b). As the cyanobacterial hydrogenase enzyme complex has been proposed to act as an electron valve releasing some of the supernumerary electrons (Carrieri et al., 2011), we have tested the H_2O_2 tolerance of the presently reported hydrogenase mutants. The $\Delta\text{hoxEFUYH}::\text{Km}^r$ (deletion) mutant appeared to be more sensitive to H_2O_2 than the WT strain and the CE-*hoxEFUYHW* mutant in that order (Fig. 6). By contrast, the overexpression of the *hypABCDEF* genes actually decreased the tolerance to H_2O_2 , as shown by the comparison of the WT strain and the CE-*hypABCDEF* mutant on one hand, and the mutants CE-*hoxEFUYHW* and CE-*hoxEFUYHW-hypABCDEF* on the other hand (Fig. 6). Collectively, these findings showed that the *hoxEFUYH* operon and the *hypABCDEF* genes contribute to H_2O_2 tolerance, positively (*hoxEFUYH* operon) and negatively (*hypABCDEF*). Future experiments will be required to test whether the higher H_2O_2 tolerance directed by the overexpression of the *hoxEFUYH* operon is due, directly or indirectly, to the increased abundance of (i) the HoxHY hydrogenase enzyme *per se*, (ii) the HoxEFU diaphorase enzyme, and/or (iii) the Sll1222, Ssl2420 and Sll1225 proteins of as yet unknown function.

3.9. The *hoxEFUYH* operon operates in the defense against the stress (likely redox) triggered by the reduced carbon metabolites glucose and glycerol

Several lines of previous evidences prompted us to test the influence of the reduced

carbon metabolites glycerol and glucose on the growth of the hydrogenase mutants presently reported. Glycerol, a cheap surplus of saponification and biodiesel industries (da Silva et al., 2009), and glucose were both shown to stimulate hydrogen photoproduction in the cyanobacteria *Cyanothece* ATCC 51142 (Bandyopadhyay et al., 2010) and *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* CS-328 (Carrieri et al., 2008), respectively. These data suggested that hydrogen photoproduction is often limited by reductant availability. In addition, we have previously reported that glucose is toxic to *Synechocystis* incubated under an otherwise physiological illumination (Narainsamy et al., 2013a), likely because it decreases CO₂-assimilation that normally consume a large number of photosynthetic electrons, thereby enabling the spared electrons to recombine with O₂ to generate toxic reactive oxygen species. Like glucose, glycerol was found to be toxic to the WT strain growing under a normal light fluence (Fig. 7), in agreement with a previous report (Rippka and Stanier, 1979). In contrast, the presently constructed hydrogenase overproducing mutants *CE-hoxEFUYH* and *CE-hoxEFUYH-hypABCDE* were killed by neither glucose nor glycerol (Fig. 7). These findings are consistent with the proposal that the Hox hydrogenase enzyme reoxidizes NAD(P)H during fermentative conditions to allow catabolism of endogenous carbohydrates to proceed (Carrieri et al., 2011). Collectively these findings strengthened the proposal that hydrogenase operates as an electron valve, preventing supernumerary photosynthetic electrons to recombine with O₂ to generate toxic reactive oxygen species.

4. Discussion

In spite of valuable previous studies, the role of the hydrogen metabolism remains puzzling in cyanobacteria, and the activity of the Ni-Fe hydrogenase, the hydrogen-producing enzyme, remains low (Carrieri et al., 2011; Eckert et al., 2012; McIntosh et al., 2011). In the prospect of engineering cyanobacteria for the biological production of hydrogen, we have studied the hydrogen production machine of the model unicellular strain *Synechocystis* PCC6803 through deletion of the hydrogenase-encoding *hoxEFUYH* operon, as well as the over-expression of the *hoxEFUYH* operon alone, or in combination with the *hypABCDE* genes (Fig. 1), which operate in assembly of the HoxEFUYH enzyme complex. The presently constructed $\Delta hoxEFUYH::Km^r$ mutant deleted of the whole *hoxEFUYH* operon (supplementary Fig. S2-4) grew as fit as the wild-type (WT) strain (supplementary Fig. S5), showing that the *hoxEFUYH* operon is dispensable to *Synechocystis*. This finding is consistent with the previously reported dispensability of the *hoxHY* genes in the WT strain (Pinto et al., 2012), and of the *hoxEFUYH* operon in the glucose tolerant mutant (Eckert et al., 2012). The construction of the mutants for concomitant over-expression of the *hoxEFUYH* operon and the *hypABCDE* genes (Fig.1) was a challenging task due to the large size of the octacistronic *hoxEFUYH* operon and the scattering of the *hypABCDE* genes in the *Synechocystis* genome (supplementary Fig. S1). To increase the expression of the *hoxEFUYH* operon (directed by a weak promoter (Dutheil et al., 2012)) and the *hypABCDE* genes, while caring with the possibility that above a certain level they might become toxic, we used the $\lambda CI_{857}-\lambda p_R$ system that expresses genes proportionally to the temperature of growth (Ferino and Chauvat, 1989; Marteyn et al., 2013; Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994): *i.e.* absence of expression at 30°C (the standard growth temperature) and strong expression at 39°C (good growth of wild-type cells). Practically (supplementary Fig. S6-10), we replaced the weak (Dutheil et al., 2012) natural promoter of the *hoxEFUYH* operon, by the $Km^r-\lambda CI_{857}-\lambda p_R$ DNA cassette and we cloned the *hypABCDE* genes in the Sm^r/Sp^r autonomously replicating plasmid pFC1 (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994) under the control of the same $\lambda CI_{857}-\lambda p_R$ system. As expected, the resulting mutants expressed the *hoxEFUYH* operon alone (TR-*hoxEFUYH* mutant) or together with the *hypABCDE* genes (TR-*hoxEFUYH-hypABCDE* mutant) depending on the growth temperature (no expression at 30°C, strong expression at

39°C; Fig. 2-3). The strong expression (at 39°C) of the *hoxEFUYH* operon and the *hypABCDE* genes were not detrimental to cell fitness and increased hydrogenase activity, which could be further enhanced by the supplementation of extra iron and nickel atoms. Together with the increased Ni- and Fe-availabilities, the overexpression of the *hoxEFUYH* operon alone or in combination with the *hypABCDE* genes led to an eight-fold or thirteen-fold higher hydrogenase activity, respectively (Fig. 2). To our knowledge the TR-*hoxEFUYH-hypABCDE* is the first cyanobacterial mutant overexpressing simultaneously the endogenous *hoxEFUYH* and *hypABCDE* genes *in vivo*. Thanks to the tight temperature-control of the hydrogenase activity of this mutant (no activity at 30°C, high activity at 39°C) it will be possible in the future to use high-throughput "omics" techniques to perform a kinetic analysis of the global cell responses to hydrogen production, and attempt distinguishing between rapid (likely direct) responses, and slow (likely indirect) responses.

Meanwhile, in the prospect of engineering a powerful cell factory for the biological production of hydrogen we attempted to further increase the hydrogenase activity level. We deleted the λ cI₈₅₇ repressor-encoding gene from the above-mentioned constructions, because it is not totally inactivated at 39°C (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994) and *Synechocystis* grows poorly at higher temperatures. The resulting mutants CE-*hoxEFUYH* and CE-*hoxEFUYH-hypABCDE* (CE stands for constitutive high-level expression) grew as fit as WT cells (Fig. 4-5) and in the presence of Fe- and Ni-supplemented medium displayed an increased hydrogenase activity (fourteen-fold in CE-*hoxEFUYH* and seventeen-fold in CE-*hoxEFUYH-hypABCDE*) as compared to WT cells growing in standard medium. Like the temperature-controlled mutants these constitutive expression mutants displayed a much higher increase in expression of the *hoxEFUYH* and *hypABCDE* genes than of the hydrogenase activity (Fig. 4-5) indicating that other limiting factors should be dealt with. In this frame we will pay a particular attention to glutathionylation (the formation of a mixed-disulfide between the cysteines residues of a protein and a molecule of glutathione (the anti-oxidant tripeptide γ -glutamyl-cysteinyl-glycine) because we recently reported that the AbrB2 hydrogen regulator, and the mercuric reductase enzyme, can be glutathionylated (Marteyn et al., 2013; Sakr et al., 2013).

Meanwhile, the presently constructed mutants proved useful to advance our understanding on the physiological role of the hydrogenase enzyme complex, which was very limited so far. We compared the H₂O₂ tolerance of the WT and mutant strains to test whether the cyanobacterial hydrogenase enzyme truly acts as an electron valve releasing excess of photosynthetic electrons (Carrieri et al., 2011) to prevent their recombination with O₂ that generates toxic reactive oxygen species limit the production of reactive oxygen species. Interestingly, we found that the *hoxEFUYH* operon and the *hypABCDE* genes contribute to the defense against H₂O₂ (Fig. 6), positively (*hoxEFUYH* operon) and negatively (*hypABCDE*). In addition, we have tested the influence on our mutants of the reduced-carbon metabolites glucose and glycerol, a cheap surplus of industries (da Silva et al., 2009), because they were shown to stimulate hydrogen production in the cyanobacteria *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* (Carrieri et al., 2008) and *Cyanothece* ATCC 51142 (Bandyopadhyay et al., 2010), respectively. Both glucose and glycerol were toxic to the WT strain growing under a normal light fluence (Fig. 7), probably because these reduced metabolites somehow decline the electrons consuming CO₂-assimilation, thereby allowing spared electrons to recombine with O₂ and generate oxidative stress. By contrast, glucose nor glycerol did not kill the hydrogenase overproducing mutants CE-*hoxEFUYH* and CE-*hoxEFUYH-hypABCDE* (Fig. 7), in agreement with the proposal that the Hox hydrogenase enzyme reoxidizes NAD(P)H during fermentative conditions to allow the catabolism of endogenous carbohydrates (Carrieri et al., 2011). Collectively our findings strengthened the proposal that hydrogenase operates as an electron valve, preventing supernumerary photosynthetic electrons to recombine with O₂ to generate toxic reactive oxygen species. We view the

hydrogenase complex as an important enzyme to cyanobacteria as *Synechocystis*, which likes growing as biofilm, a thick network of autoaggregated cells tightly connected by abundant network of exopolysaccharides (Jittawuttipoka et al., 2013), where the cells are certainly frequently exposed to H₂O₂ and reduced metabolites released by neighbours (living, or dying and lysing). This view is conformed by the absence of hydrogenase enzyme in most planktonic cyanobacteria living in open oceans.

5. Conclusions

In this study, we demonstrate through gene deletion and overexpression that the *hoxEFUYH* operon operates in the protection against H₂O₂, glycerol and glucose, and that the simultaneous over-production of the HoxEFUYH and HypABCDEF proteins combined to an increase in nickel availability led to a 20-fold increase in hydrogenase activity. We think that our temperature-controlled and constitutive mutants with increased hydrogenase contents (activities) and a healthy growth are useful cell factories for (i) the purification of large hydrogenase quantities to serve for structural analyses; (ii) to continue deciphering the biological role of the hydrogen production machine and (iii) for further genetic manipulations aiming at increasing the O₂ tolerance of the hydrogenase enzyme for a better hydrogen production.

Acknowledgement

We thank Genevieve Guedeney for the gift of the anti-HoxF and anti-HoxH antibodies.

References

- Agervald, A., et al., 2008. Transcription of the extended hyp-operon in *Nostoc* sp. strain PCC 7120. BMC Microbiol. 8, 69.
- Aubert-Jousset, E., et al., 2011. Role of HoxE subunit in *Synechocystis* PCC6803 hydrogenase. FEBS J. 278, 4035-43.
- Bandyopadhyay, A., et al., 2010. High rates of photobiological H₂ production by a cyanobacterium under aerobic conditions. Nat Commun. 1, 139.
- Carrieri, D., et al., 2008. Renewable hydrogen production by cyanobacteria: Nickel requirements for optimal hydrogenase activity. International Journal of Hydrogen Energy. 33, 2014-2022.
- Carrieri, D., et al., 2011. The role of the bidirectional hydrogenase in cyanobacteria. Bioresour Technol. 102, 8368-77.
- Cournac, L., et al., 2004. Sustained photoevolution of molecular hydrogen in a mutant of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 deficient in the type I NADPH-dehydrogenase complex. J Bacteriol. 186, 1737-46.
- da Silva, G. P., et al., 2009. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. Biotechnol Adv. 27, 30-9.
- Domain, F., et al., 2004. Function and regulation of the cyanobacterial genes *lexA*, *recA* and *ruvB*: LexA is critical to the survival of cells facing inorganic carbon starvation. Mol Microbiol. 53, 65-80.
- Dutheil, J., et al., 2012. The AbrB2 autorepressor, expressed from an atypical promoter, represses the hydrogenase operon to regulate hydrogen production in *Synechocystis* strain PCC6803. J Bacteriol. 194, 5423-33.
- Eckert, C., et al., 2012. Genetic analysis of the Hox hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 reveals subunit roles in association, assembly, maturation, and function. J Biol Chem. 287, 43502-15.

Ferino, F., Chauvat, F., 1989. A promoter-probe vector-host system for the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803. *Gene*. 84, 257-66.

Germer, F., et al., 2009. Overexpression, isolation, and spectroscopic characterization of the bidirectional [NiFe] hydrogenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem*. 284, 36462-72.

Grigorieva, G., Shestakov, S., 1982. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp 6803. *FEMS Microbiol Lett*. 13, 367-370.

Gutekunst, K., et al., 2006. Metal dependence and intracellular regulation of the bidirectional NiFe-hydrogenase in *Synechocystis* sp PCC 6803. *International Journal of Hydrogen Energy*. 31, 1452-1459.

Gutekunst, K., et al., 2005. LexA regulates the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a transcription activator. *Mol Microbiol*. 58, 810-23.

Heckman, K. L., Pease, L. R., 2007. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc*. 2, 924-32.

Imlay, J. A., 2013. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat Rev Microbiol*. 11, 443-54.

Jittawuttipoka, T., et al., 2013. Multidisciplinary evidences that *Synechocystis* PCC6803 exopolysaccharides operate in cell sedimentation and protection against salt and metal stresses. *PLoS One*. 8, e55564.

Labarre, J., et al., 1989. Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *J Bacteriol*. 171, 3449-57.

Leplat, C., et al., 2013. Genome-wide transcriptome analysis of hydrogen production in the cyanobacterium *Synechocystis*: Towards the identification of new players. *International Journal of Hydrogen Energy*. 38, 1866-1872.

Maeda, T., et al., 2008. Metabolic engineering to enhance bacterial hydrogen production. *Microb Biotechnol*. 1, 30-9.

Marteyn, B., et al., 2013. The *Synechocystis* PCC6803 MerA-Like Enzyme Operates in the Reduction of Both Mercury and Uranium under the Control of the Glutaredoxin 1 Enzyme. *J Bacteriol*. 195, 4138-45.

McIntosh, C. L., et al., 2011. The [NiFe]-Hydrogenase of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803 Works Bidirectionally with a Bias to H₂ Production. *Journal of the American Chemical Society*. 133, 11308-11319.

Mermet-Bouvier, P., Chauvat, F., 1994. A conditional expression vector for the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strains PCC6803 and PCC6714 or *Synechococcus* sp. strains PCC7942 and PCC6301. *Curr Microbiol*. 28, 145-8.

Narainsamy, K., et al., 2013a. High performance analysis of the cyanobacterial metabolism via liquid chromatography coupled to a LTQ-Orbitrap mass spectrometer: evidence that glucose reprograms the whole carbon metabolism and triggers oxidative stress. *Metabolomics*. 9, 21-32.

Narainsamy, K., et al., 2013b. Genomics of the pleiotropic glutathione system in cyanobacteria. In: Chauvat, F., Cassier-Chauvat, C., Eds.), *Genomics of Cyanobacteria*. vol. 65. Academic Press, Elsevier, pp. 157-188.

Oliveira, P., Lindblad, P., 2005. LexA, a transcription regulator binding in the promoter region of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol Lett*. 251, 59-66.

Pinto, F., et al., 2012. Construction of a chassis for hydrogen production: physiological and molecular characterization of a *Synechocystis* sp. PCC 6803 mutant lacking a functional bidirectional hydrogenase. *Microbiology*. 158, 448-64.

- Poncelet, M., et al., 1998. Targeted deletion and mutational analysis of the essential (2Fe-2S) plant-like ferredoxin in *Synechocystis* PCC6803 by plasmid shuffling. *Mol Microbiol.* 28, 813-21.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., Herdman, M., and, Stanier, R., 1979. Generic assignments, strains histories and properties of pure culture of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 111, 1-61.
- Sakr, S., et al., 2013. The activity of the *Synechocystis* PCC6803 AbrB2 regulator of hydrogen production can be post-translationally controlled through glutathionylation. *International Journal of Hydrogen Energy.* 38, 13547-13555.

FIGURES

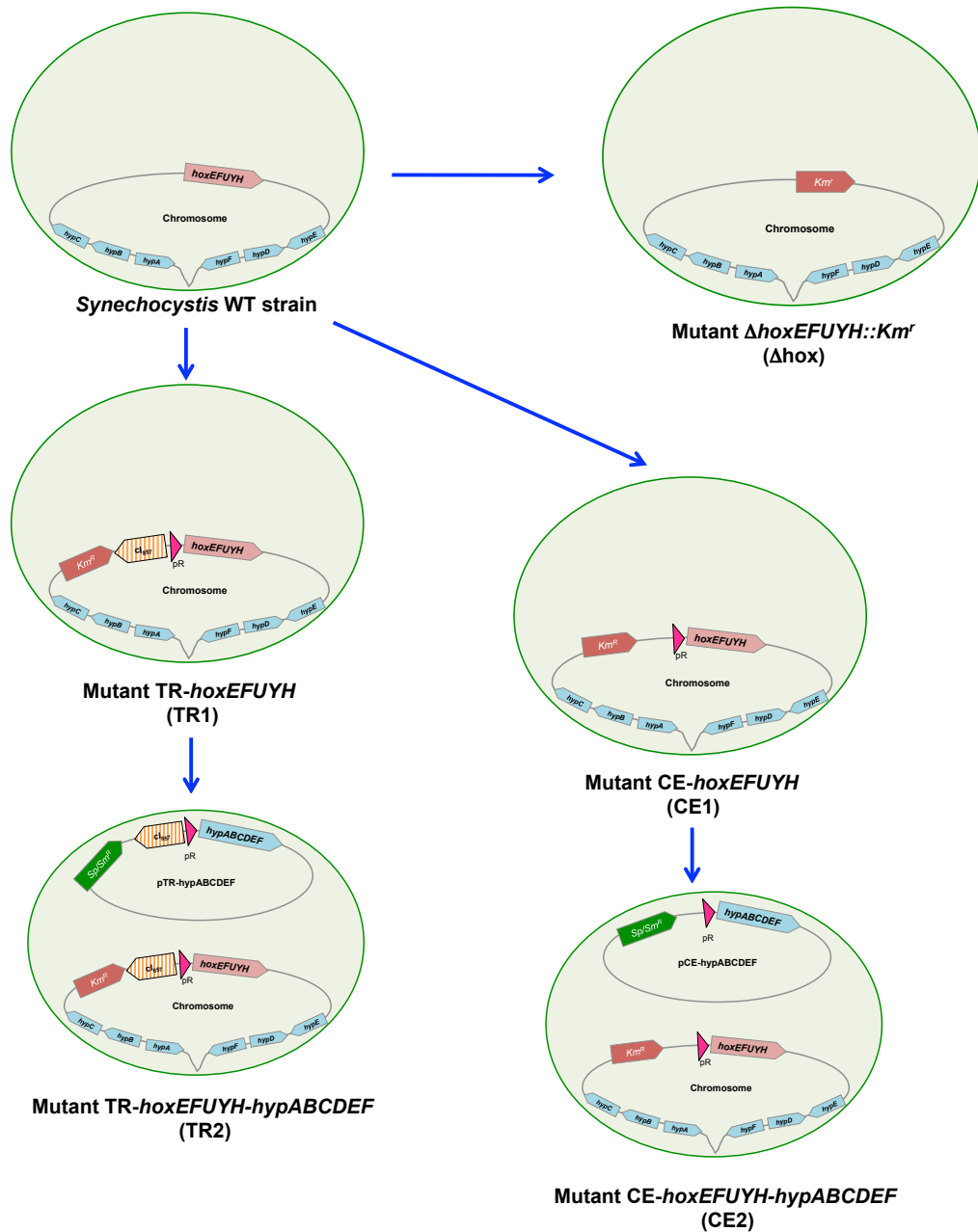


Fig. 1. Schematic representation of the *Synechocystis* wild-type strain (WT; top circle) and the mutants constructed in this study (abbreviated names Δhox , TR1, TR2, CE1 or CE2). The *Synechocystis* spherical cells are represented by the green circles. The chromosome is shown as the black line form attached to the cell membrane, while the pTR-*hypABCDEF* and pCE-*hypABCDEF* replicating plasmids are represented by circles. The *hoxEFUYH* operon, the *hypABCDEF* genes and the antibiotic resistance markers are shown by large colored arrows, which indicate the direction of their transcription. The hatched (orange) arrow shows the λcI_{857} gene encoding the temperature-sensitive repressor, which tightly controls the activity of the otherwise strong λp_R promoter (red triangle), depending on the growth temperature. The symbols are namely: Δ for deletion; CE for constitutive expression; TR for temperature-regulated expression; and WT for wild-type.

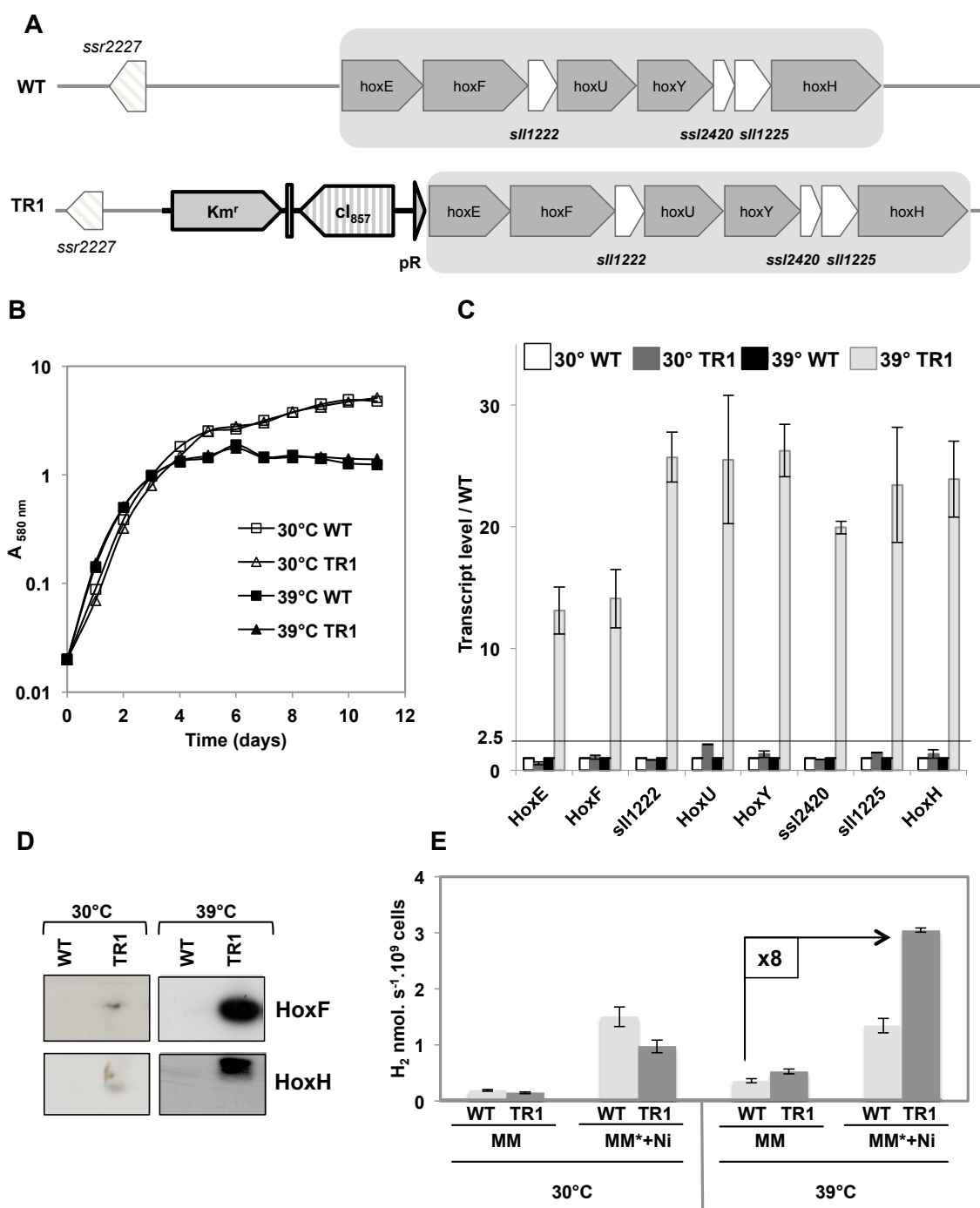


Fig. 2. Analysis of the *Synechocystis* TR-*hoxEFUYH* mutant for temperature regulated high-level expression of the *hoxEFUYH* operon. (A) Schematic representation of the *hoxEFUYH* operon locus in the wild-type strain (WT) and the TR-*hoxEFUYH* mutant (TR1). (B) Typical growth of the WT (squares) and TR1 cells (triangles) under standard light at 30°C (open symbols) or 39°C (black symbols). (C) Histogram representation of the ratio of the transcript abundance (measured by Real-time quantitative PCR) of each eight genes of the *hoxEFUYH* operon in the WT and TR1 cells grown at 30°C or 39°C. (D) Western blot analysis of the abundance of the HoxF and HoxH proteins in WT and TR1 cells grown at 30°C or 39°C. (E) Histograms representation of the hydrogenase activities of WT and TR1 cells grown at 30°C or 39°C in standard medium (MM) or MM* (MM + 17 μ M $\text{Fe}(\text{NH}_4)\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) supplemented with 2.5 μ M NiSO_4 . All experiments were performed at least three times.

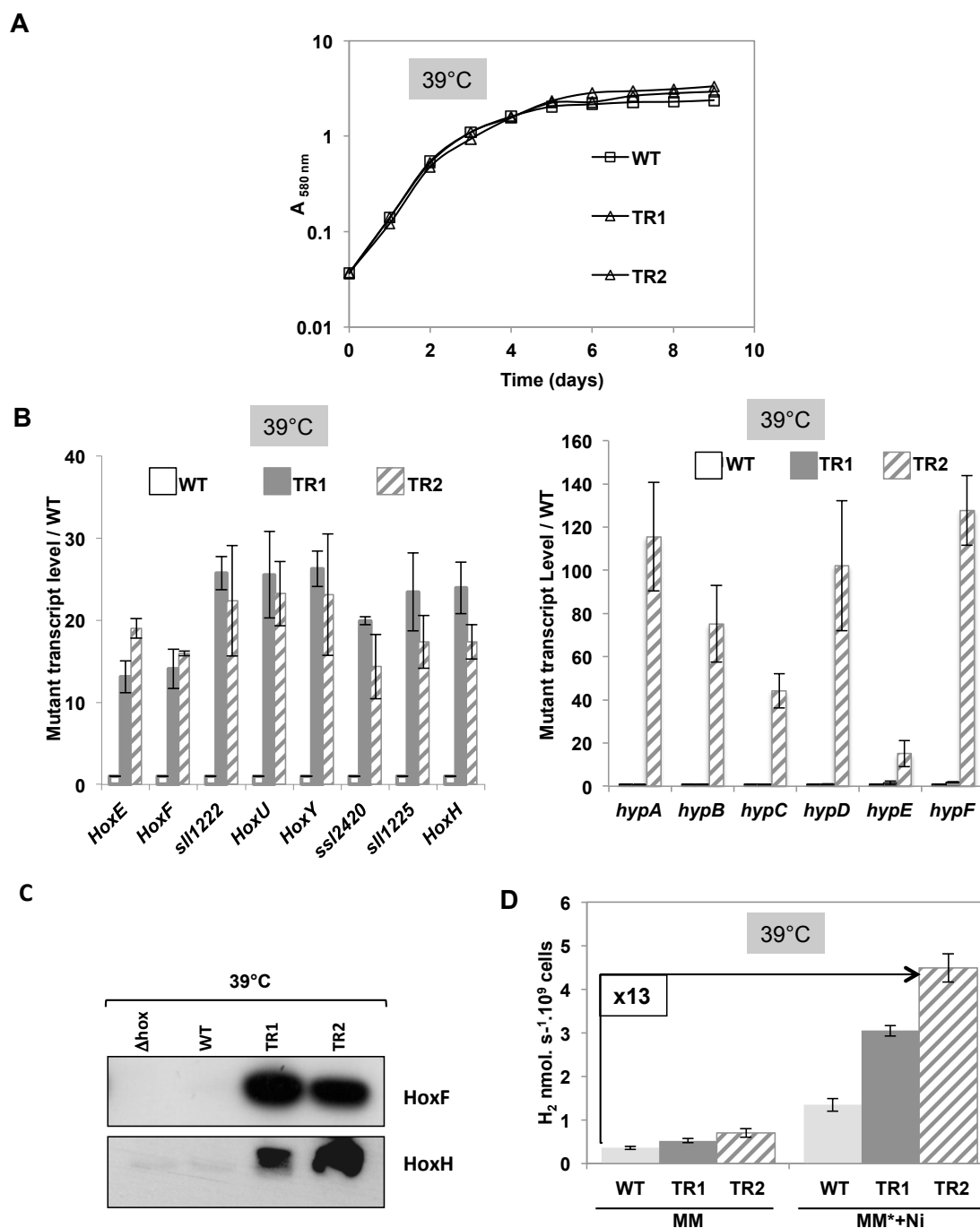


Fig. 3. Analysis of the *Synechocystis* TR-*hoxEFUYH-hypABCDE* mutant for temperature regulated high-level expression of the *hoxEFUYH* operon and the six genes *hypABCDE*. All experiments were performed at least three times on cells grown under standard light, at 39°C to induce the expression of the *hoxEFUYH* operon and the *hypABCDE* genes controlled by the λcI_{857} - λp_R system. **(A)** Typical growth of the WT (squares), TR-*hoxEFUYH* (TR1; white triangles) and TR-*hoxEFUYH-hypABCDE* (TR2; grey triangles) strains. **(B)** Histogram plot representation of the transcript abundance (measured by Real-time quantitative PCR) of the eight genes of the *hoxEFUYH* operon (left part) and six *hypABCDE* genes (right part) in WT (white bars), TR1 (grey bars) or TR2 (hatched bars) cells. **(C)** Western blot analysis of the abundance of the HoxF and HoxH proteins in WT, TR1 or TR2 cells. **(D)** Histograms representation of the hydrogenase activities of WT (light grey), TR1 (dark grey) or TR2 (hatched bars) growing in standard medium (MM) or MM* (MM + 17 μ M $\text{Fe}(\text{NH}_4)\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) supplemented with 2.5 μ M NiSO_4 .

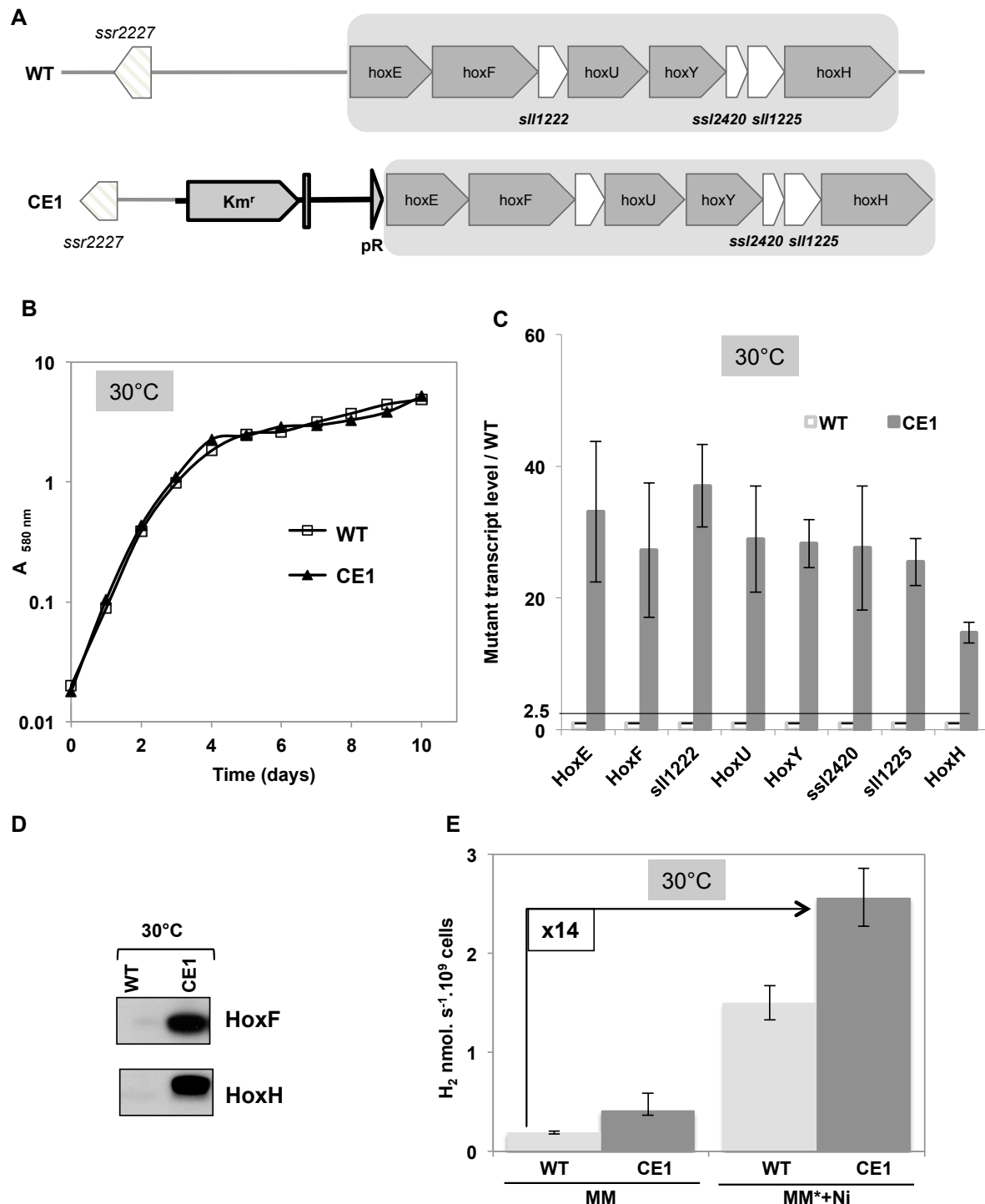


Fig. 4. Analysis of the *Synechocystis* CE-*hoxEFUYH* mutant for strong constitutive expression of the *hoxEFUYH* operon. All experiments were performed at least three times on cells grown at 30°C under standard light. **(A)** Schematic representation of the *hoxEFUYH* operon locus in the WT strain or the CE-*hoxEFUYH* mutant (CE1). **(B)** Typical growth of the WT (squares) or CE1 (triangles) cells. **(C)** Histogram representation of the ratio of the transcript abundance (measured by Real-time quantitative PCR) of the eight genes of the *hoxEFUYH* operon in CE1 cells (dark grey bars), as compared to WT (light grey). **(D)** Western blot analysis of the abundance of the HoxF and HoxH proteins in WT and CE1 cells. **(E)** Histograms representation of the hydrogenase activities of WT and CE1 cells grown in standard medium (MM) or MM* (MM + 17 μ M $\text{Fe}(\text{NH}_4)\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) supplemented with 2.5 μ M NiSO_4 .

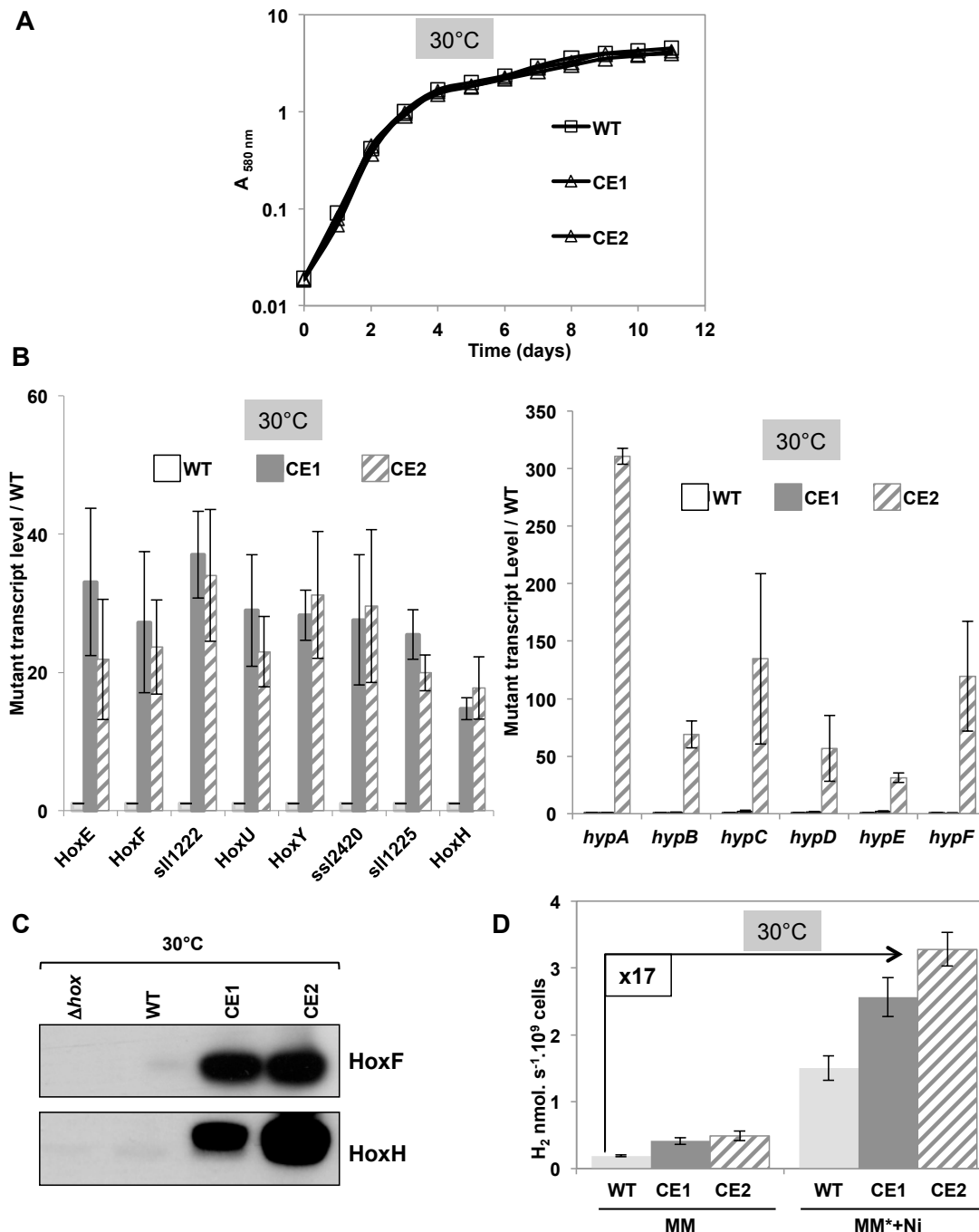


Fig. 5. Analysis of the *Synechocystis* CE-*hoxEFUYH-hypABCDEF* mutant for strong constitutive expression of the *hoxEFUYH* operon and the *hypABCDEF* genes. All experiments were performed at least three times on cells grown at 30°C under standard light. **(A)** Typical growth of the WT (squares), CE-*hoxEFUYH* (CE1; white triangles) and CE-*hoxEFUYH-hypABCDEF* (CE2; grey triangles) cells. **(B)** Histogram plot representation of the transcript abundance (measured by Real-time quantitative PCR) of the eight genes of the *hoxEFUYH* operon (left part) and the six *hypABCDEF* genes (right part) in the CE1 (grey bars) or CE2 (hatched bars) mutants, as compared to the WT strain (white bars). **(C)** Western blot analysis of the abundance of the HoxF and HoxH proteins in WT, CE1 or CE2 cells. **(D)** Histograms representation of the hydrogenase activities of WT (light grey), CE1 (dark grey) or CE2 cells (hatched bars) growing in standard medium (MM) or MM* (MM + 17 μ M $Fe(NH_4)C_6H_5O_7$) supplemented with 2.5 μ M $NiSO_4$.

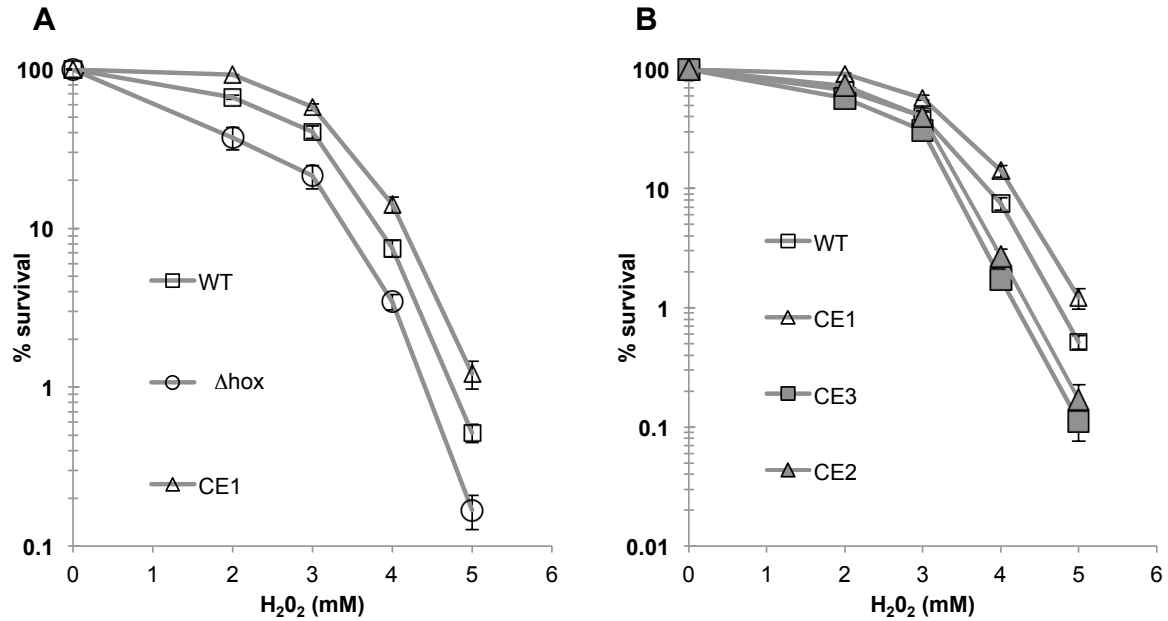


Fig. 6. Influence of the *hoxEFUYH* operon and the *hypABCDEF* genes on the *Synechocystis* tolerance to oxidative stress triggered by H_2O_2 . **(A)** Typical survival of the *Synechocystis* strains WT (open squares), $\Delta hoxEFUYH::Km^r$ (Δhox , open circles) or CE-*hoxEFUYH* (CE1, open triangles) grown at 30°C and challenged for 1 hour with H_2O_2 under anaerobiosis before plating under standard photoautotrophic conditions. **(B)** Typical survival to the H_2O_2 stress of the WT strain (open squares), CE1 (open triangles), CE-*hoxEFUYH-hypABCDEF* (CE2, dark-grey triangles), CE-*hypABCDEF* (CE3, dark-grey squares). All experiments were performed at least three times.

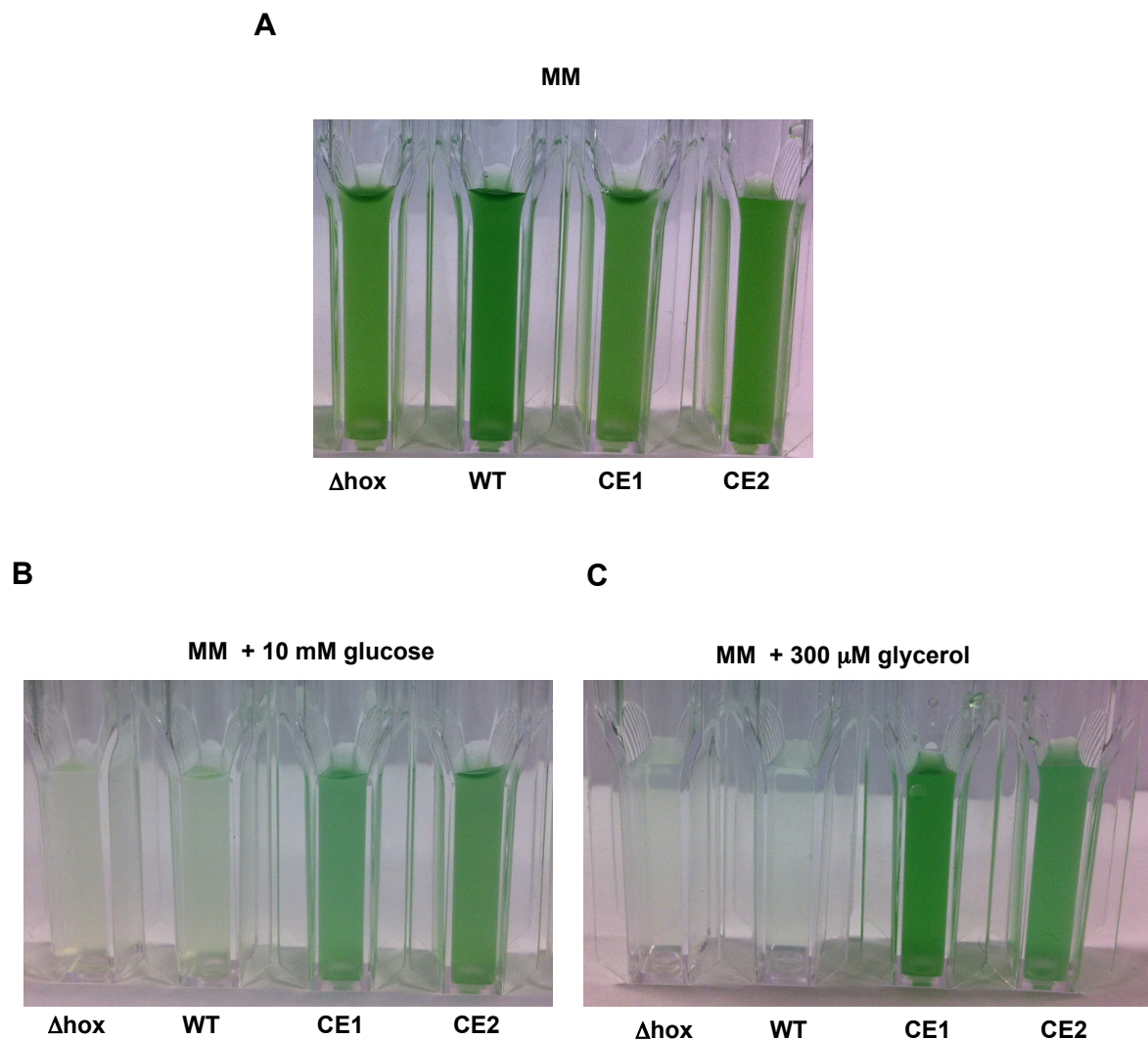


Fig. 7. Influence of the *hoxEFUYH* operon and the *hypABCDEF* genes on the growth of *Synechocystis* in the presence of light and glucose or glycerol. Typical growth of the wild-type strains (WT), $\Delta hoxEFUYH::Km^r$ (Δhox), CE-*hoxEFUYH* (CE1) and CE-*hoxEFUYH-hypABCDEF* (CE2). Cells grown twice in standard (MM) liquid medium (up to mid-log phase) were inoculated in MM (panel **A**) or MM supplemented with glucose 10 mM (panel **B**) or 300 mM glycerol (panel **C**) and incubated under light (3,000 luxes) during 7 days. All experiments were performed at least three times.

Supplementary Figures

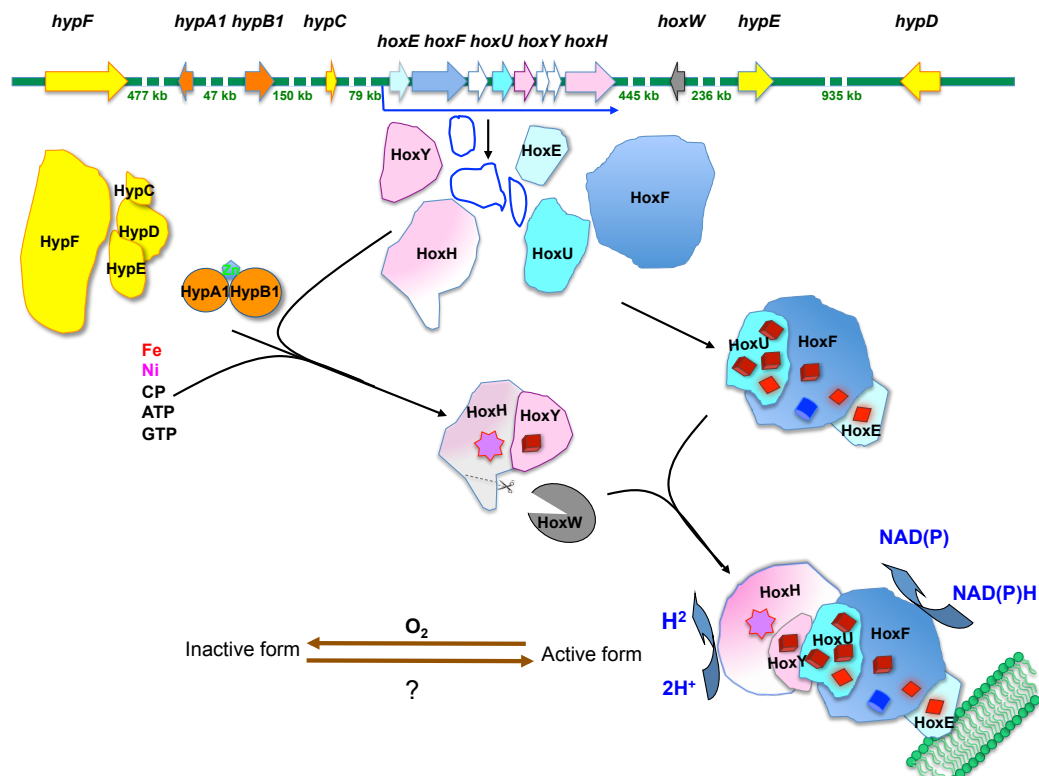


Fig. S1. Schematic representation of hydrogen production machine in *Synechocystis* PCC6803 adapted from (Carrieri et al., 2011). The genes are represented by arrows, which point in the direction of their transcription (<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/>), and are colored similarly to their protein products. The green numbers indicate the spacing distance (in kilobases) between the scattered genes. The *hoxEFUHY* operon is weakly transcribed (Dutheil et al., 2012) as the polycistronic mRNA (bent blue arrow), which encodes (i) the hydrogenase sub-complex (made by the HoxY protein and the HoxW-matured HoxH subunit); (ii) the HoxEFU diaphorase sub-complex; and (iii) the three proteins of unknown function (white forms). The electron transfer FMN cofactor, Fe-Ni center, and [4Fe-4S] and [2Fe-2S] clusters of the Hox proteins, are represented by the blue squares, the pink star, dark-red squares and light-red diamonds, respectively. The zinc-bound to HypA1 and HypB1 proteins is shown as the blue form. CP designates carbamoyl phosphate. The brown lines stand for the reversible inactivation of Hox activity mediated by oxygen. The photosynthetic membrane is represented in green.

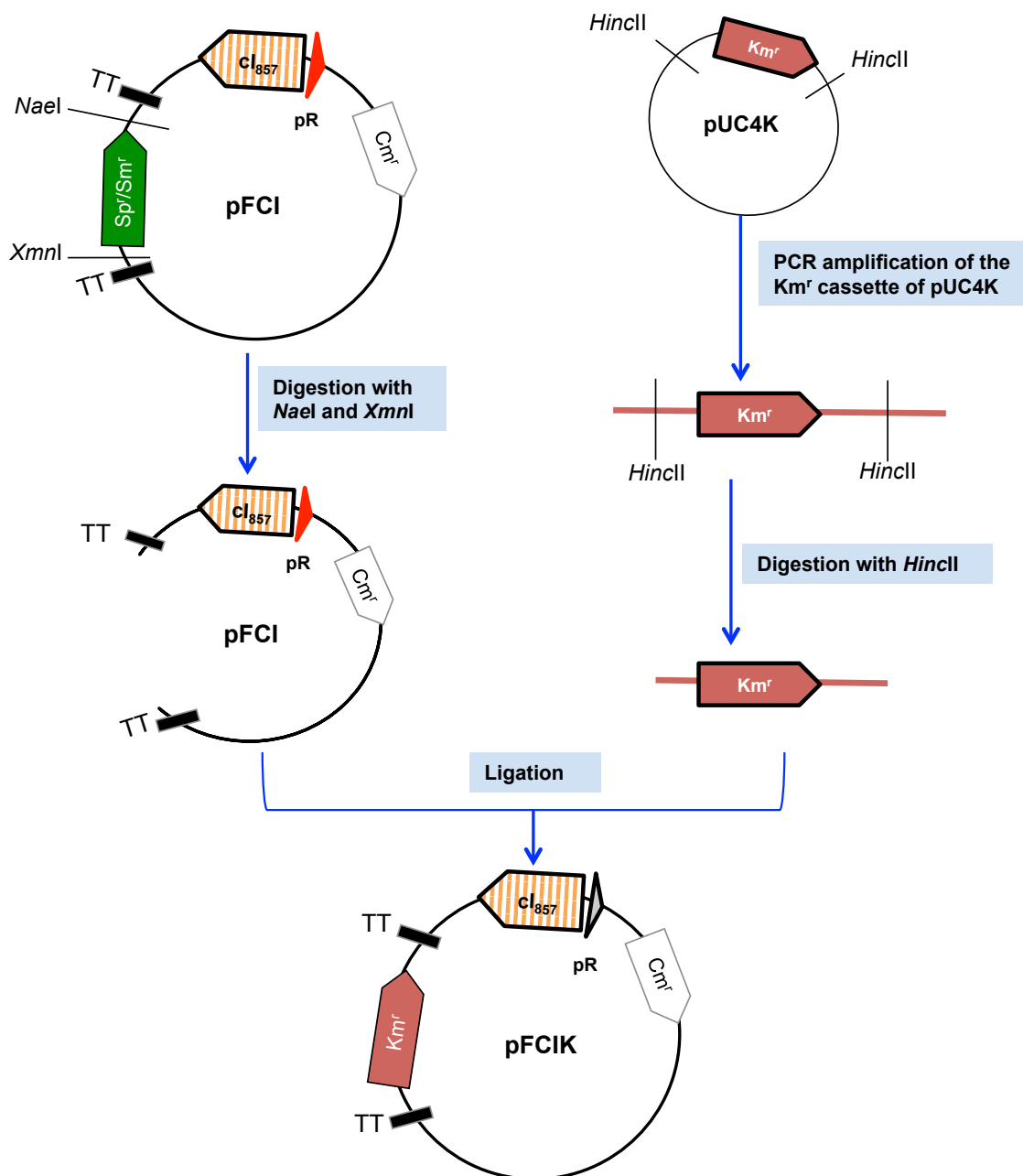


Fig. S2. Construction of the Km^r pFC1K plasmid for temperature regulated gene expression in *Synechocystis*. The genes are represented by large arrows, which point in the direction of their transcription. The red triangle indicates the strong λp_R promoter followed by the λcro ribosome-binding site (5'-AGGA-3') and ATG start codon embedded within a unique *NdeI* restriction site (5'-CATATG-3') for in frame-fusion of the studied protein-coding regions. They are expressed in a temperature-controlled way thanks to the λcI_{857} gene (hatched arrow), which encodes the temperature-sensitive repressor that tightly controls λp_R . The transcription and translation stop signals (TT) preventing read-through of gene expression from the antibiotic resistance gene (Sp^r/Sm^r in pFC1 or Km^r in pFC1K) are indicated by the black bars.

Organization of the *Synechocystis* genomic region containing the *hoxEFUYH* operon

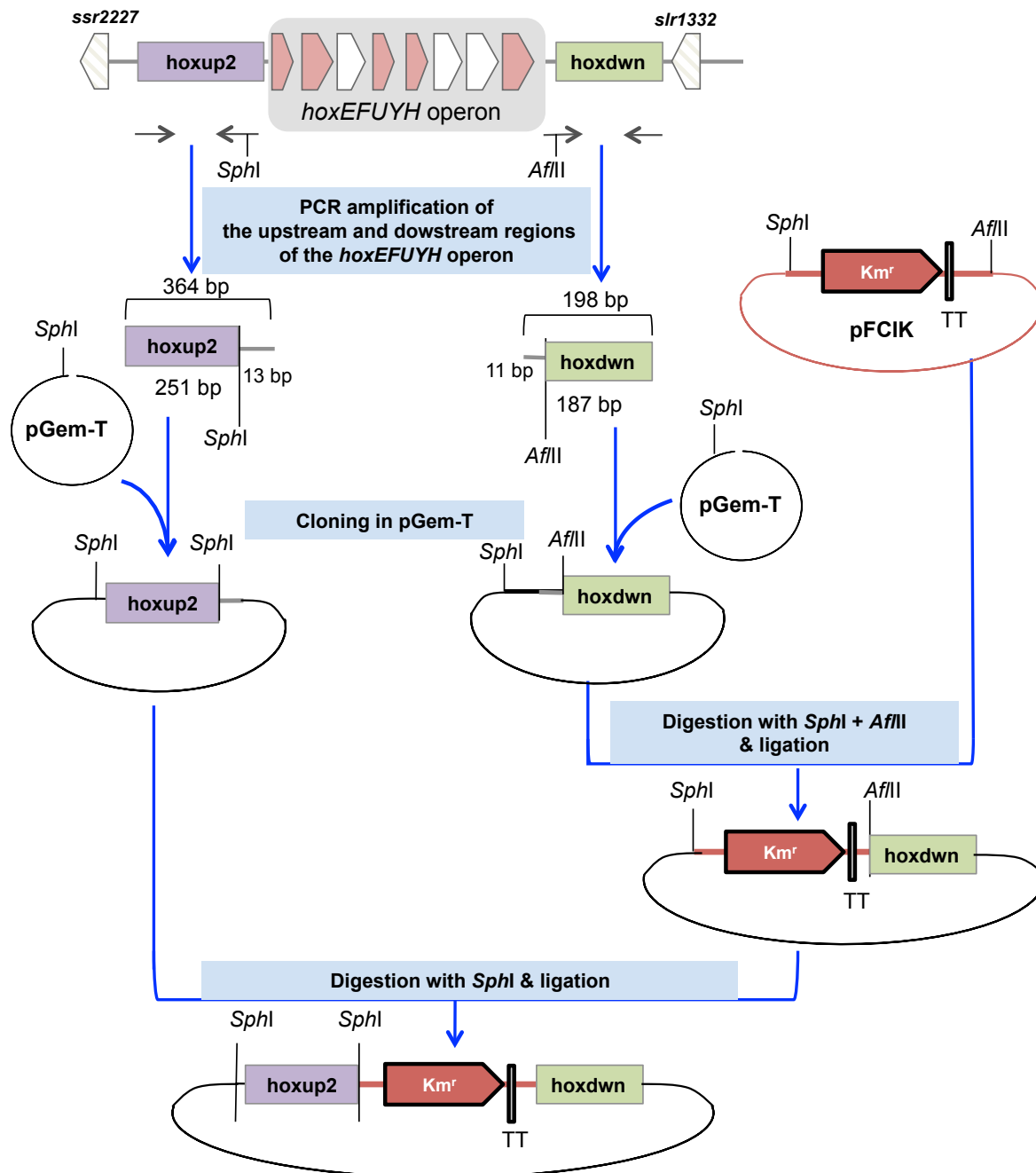


Fig. S3. Construction of the $\Delta hoxEFUYH::Km^r$ DNA cassette for the deletion of the *Synechocystis* *hoxEFUYH* operon, which comprises the *hoxE*, *hoxF*, *sll1222*, *hoxU*, *hoxY*, *sll12420*, *sll1225* and *hoxH* genes in that order (Fig. 1 and Fig. S1). The genes are represented by white (*sll1222*, *sll12420* and *sll1225*) or pink (*hoxE*, *hoxF*, *hoxU*, *hoxY* and *hoxH*) boxes, which point in the direction of their transcription. The transcription terminator (TT) preventing the read-through of expression from the *Km^r* gene is represented by the vertical grey rectangle. The rectangles designated as *hoxup2* and *hoxdown* represent the DNA regions flanking the *hoxEFUYH* operon, which served as platforms for homologous recombinations promoting the targeted replacement of the *hoxEFUYH* operon by the *Km^r* gene.

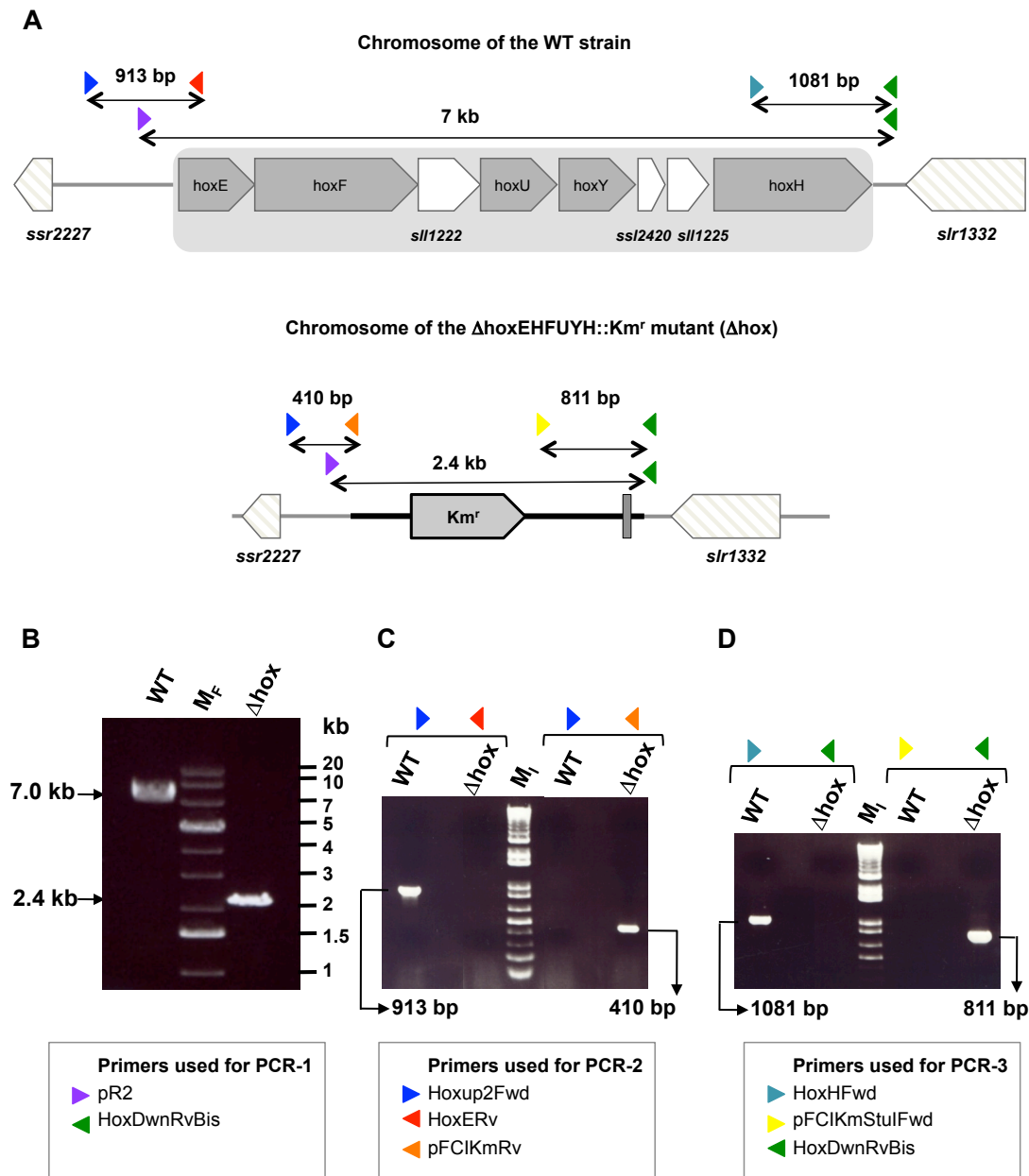


Fig. S4. PCR verification of the $\Delta hoxEFUYH::Km^r$ mutant showing that the replacement of the *hoxEFUYH* operon by the Km^r marker occurred in all copies of the polyploid chromosome of *Synechocystis*. (**A**) Schematic representation of the *hoxEFUYH* operon locus in the wild-type strain (WT) and the $\Delta hoxEFUYH::Km^r$ mutant (Δhox), which harbors the Km^r marker in place of the whole *hoxEFUYH* operon (from 58 bp upstream of the *hoxE* ATG start codon, to 8 bp downstream of the *hoxH* TAA stop codon). The small colored triangles represent the oligonucleotides primers (supplementary Table S2) that generated the PCR DNA segments (double arrows) typical of the WT strain or the Δhox mutant. (**B**) UV-light image of the agarose gel showing the 7 kb and 2.4 kb PCR-1 products typical of the chromosome organization in the WT strain and the Δhox mutant growing in standard conditions. Marker (M_F) = 1Kb plus DNA Ladder (Fermentas). (**C**) PCR-2 and (**D**) PCR-3 confirmation that Δhox mutant cells contain only Δhox mutant (no WT) chromosomes. Marker (M_I) = 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen).

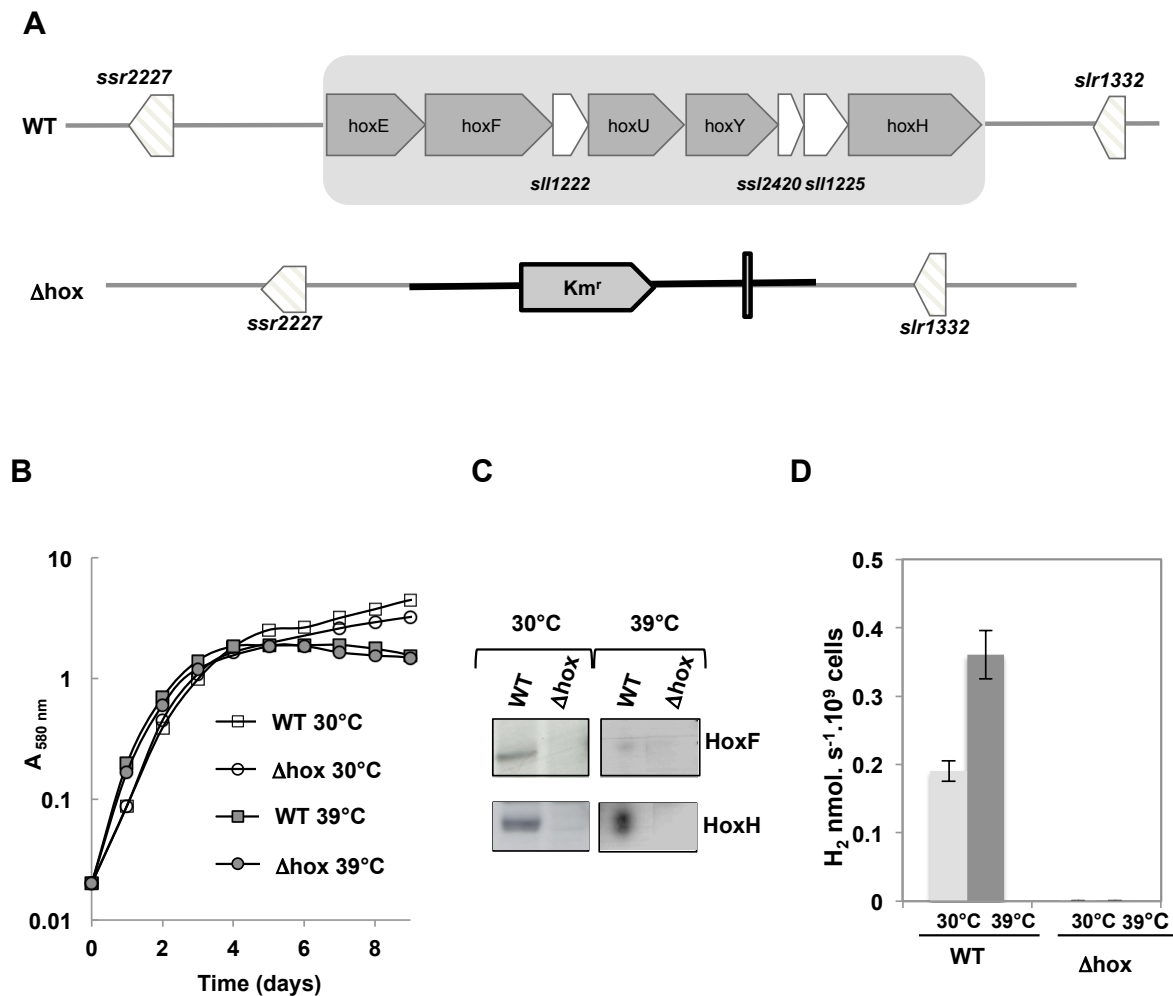


Fig. S5. Analysis of the *Synechocystis* $\Delta hoxEFUYH::Km^r$ mutant (Δhox). **(A)** Schematic representation of the *hoxEFUYH* operon locus in the WT strain or the Δhox mutant. **(B)** Typical growth of the WT (squares) and Δhox cells (circles) in standard conditions at either 30°C (open symbols) and 39°C (grey symbols). **(C)** Western blot analysis of the abundance of the HoxF and HoxH proteins in WT and Δhox cells grown at 30°C or 39°C. **(D)** Histograms representation of the hydrogenase activities of WT and Δhox cells grown at 30°C or 39°C. These experiment were performed three times.

Organization of the *Synechocystis* genomic region containing the *hoxEFUYH* operon

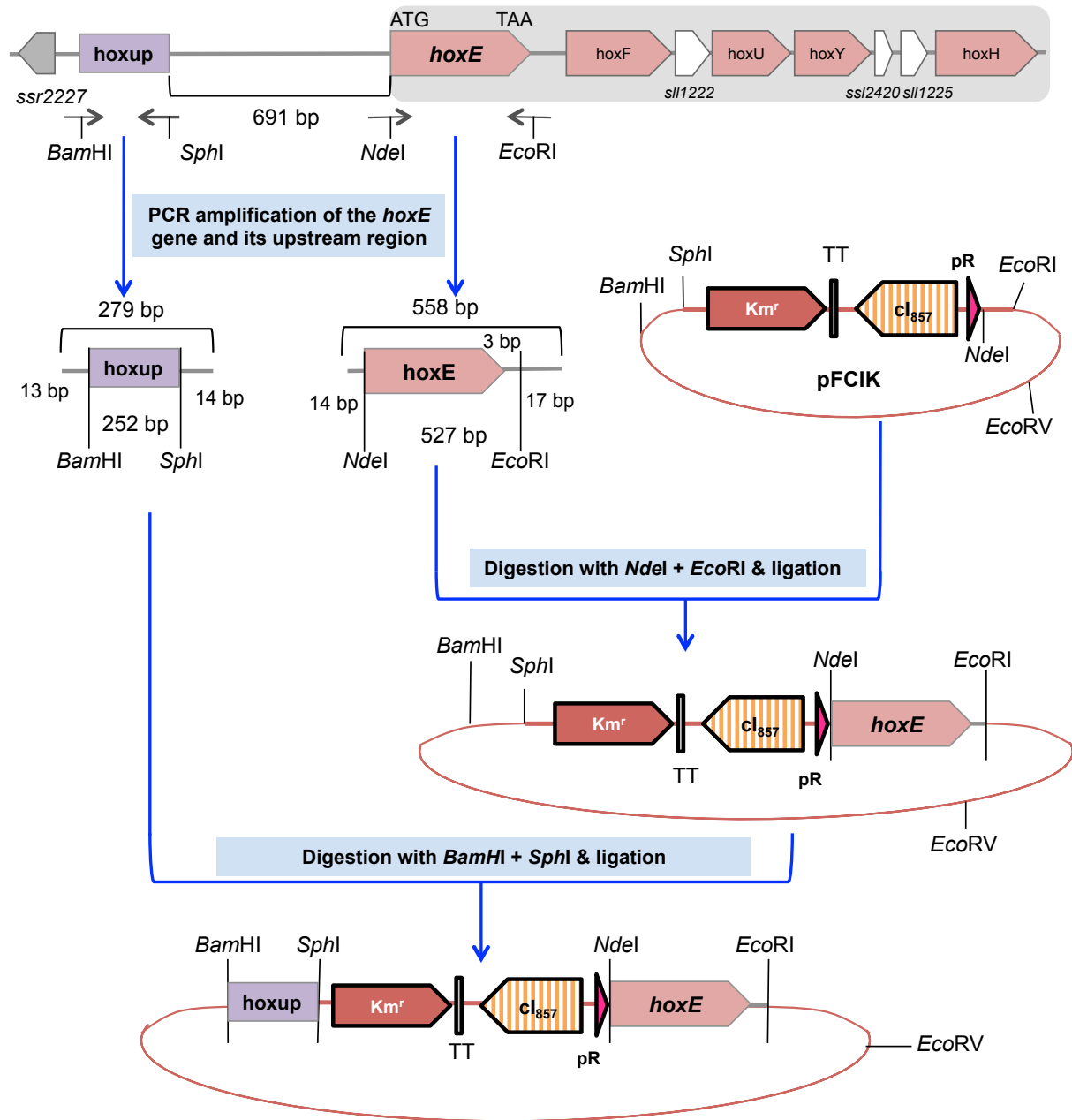


Fig. S6. Construction of the Km^r - λC_{I857} - λp_R DNA cassette for temperature controlled expression of the *Synechocystis* *hoxEFUYH* operon. The genes are represented by large arrows, which indicate the direction of their transcription. The strong λp_R promoter is represented by the red triangle oppositely oriented to the λC_{I857} gene, which encodes the temperature-sensitive repressor that tightly controls λp_R . The transcription and translation stop signals (TT), which prevent read-through of gene expression from the Km^r marker are indicated by the vertical grey bar. The *hoxup* region of DNA (purple rectangle) upstream of the *hoxEFUYH* operon promoter and the *hoxE* gene served as platform for homologous recombinations, which introduced the Km^r - λC_{I857} - λp_R DNA cassette in place of the weak promoter (Dutheil et al., 2012) of the *hoxEFUYH* operon.

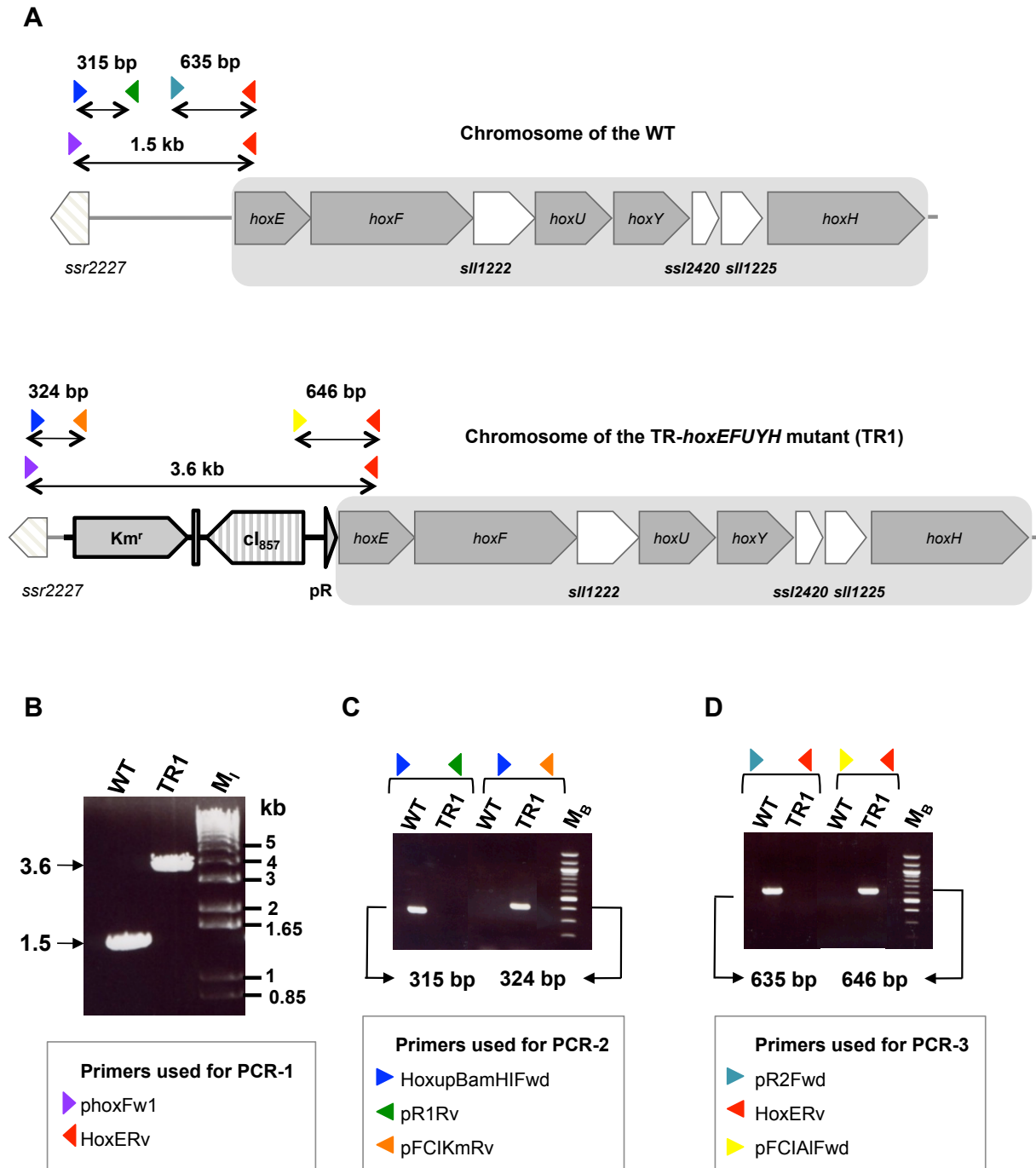


Fig. S7. PCR verification of the *Synechocystis* TR-*hoxEFUYH* mutant (TR1) for temperature regulated high-level expression of the *hoxEFUYH* operon. (A) Schematic representation of the *hoxEFUYH* operon locus in the WT strain or the TR1 mutant, which harbors the Km^r - λcI_{857} - λp_R cassette in place of the natural 691 bp-long *hoxEFUYH* promoter region (starting from the first bp upstream of the *hoxE* ATG start codon). The oligonucleotides primers represented by small colored triangles (supplementary Table S2) served for the PCR verifications indicated by double arrows. (B) UV-light image of the agarose gel showing the 1.5 kb and 3.6 kb DNA products of the PCR-1 analysis of the genome of the WT strain or the TR1 mutant. Marker (M_1) = 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). (C) PCR-2 and (D) PCR-3 confirmation that TR1 mutant cells contain only TR1 mutant (no WT) chromosomes. Marker (M_B) = 1Kb plus DNA Ladder (Biolabs).

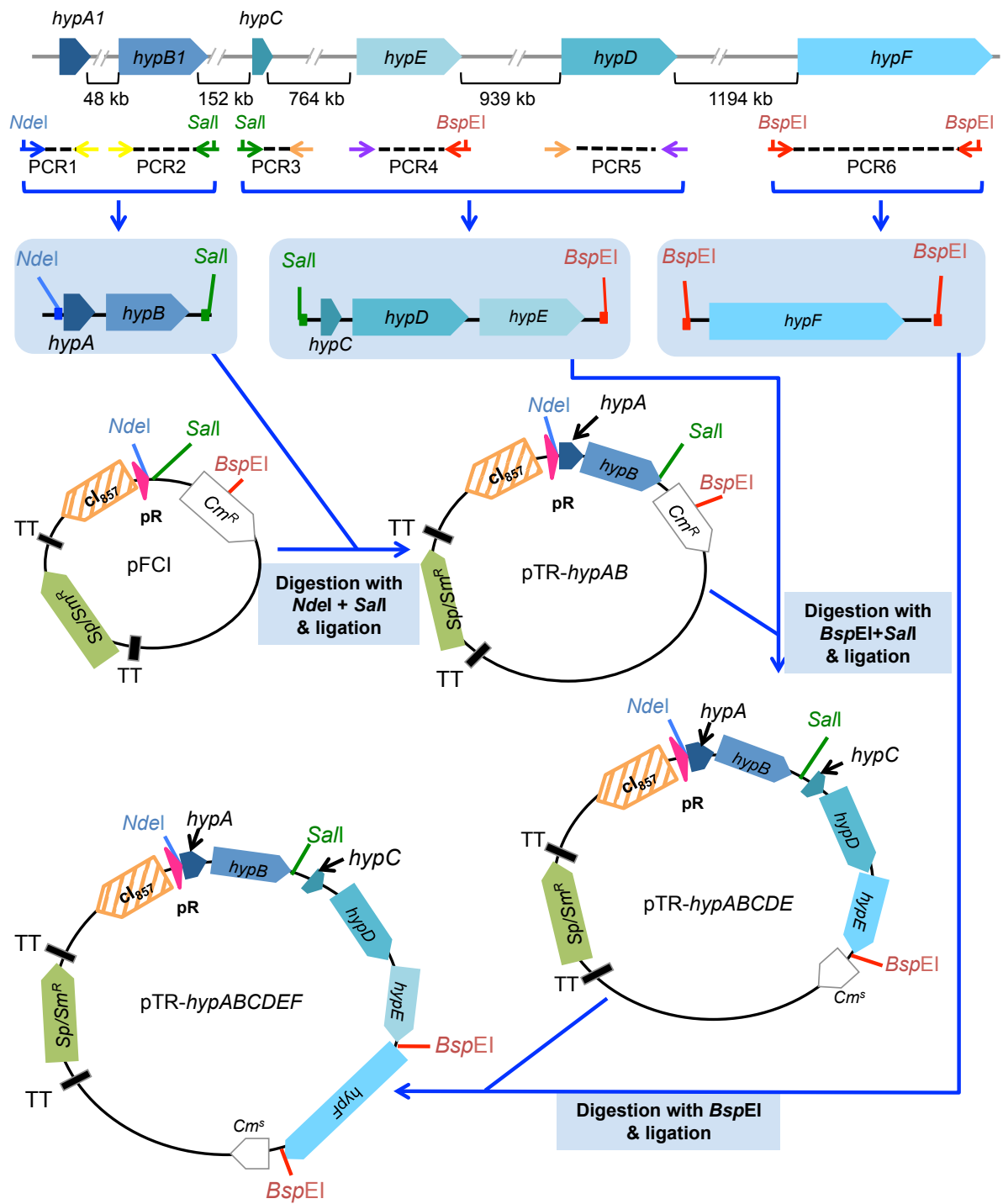


Fig. S8. Construction of the pTR-*hypABCDEF* plasmid for temperature regulated expression of the *Synechocystis hypABCDEF* genes. For the sake of clarity, the four genes *hypB1* (sll1432), *hypC* (ssl3580), *hypE* (sll1462) and *hypF* (sll0322) are represented oppositely to their natural orientation (Fig. 1 and supplementary Fig. S1). The small colored arrows indicate the position of the oligonucleotide primers used for the PCR amplification (dashed lines) and assembly (blue arrows) used for cloning the *hypABCDEF* genes into the pFC1 vector (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994), yielding pTR-*hypABCDEF*. These PCR primers (supplementary Table S2) are namely: HypA1NdeIFwd (blue rightward-pointing arrow) and HypA1ASSRv (yellow leftward-pointing arrow) for PCR1; HypB1ASSFwd (yellow rightward-pointing arrow) and HypB1SalIRv (green leftward-pointing arrow) for PCR2; HypCSalIfwdbis (green rightward-pointing arrow) and HypCASSrvbis (orange leftward-pointing arrow) for PCR3; HypEASSfwd (purple rightward-pointing arrow) and HypEBspeIrv (red leftward-pointing arrow) for PCR4; HypDASSfwd (orange rightward-pointing arrow) and HypDASSrv (purple leftward-pointing arrow) for PCR5; and HypFBspeIfwdbis (red rightward-pointing arrow) and HypFBspeIrv (red leftward-pointing arrow) for PCR6. The λp_R promoter is represented by the red triangle oppositely oriented to the λcI_{857} repressor-encoding gene. The transcription and translation stop signals (TT) preventing read-through of gene expression are indicated by grey bars.

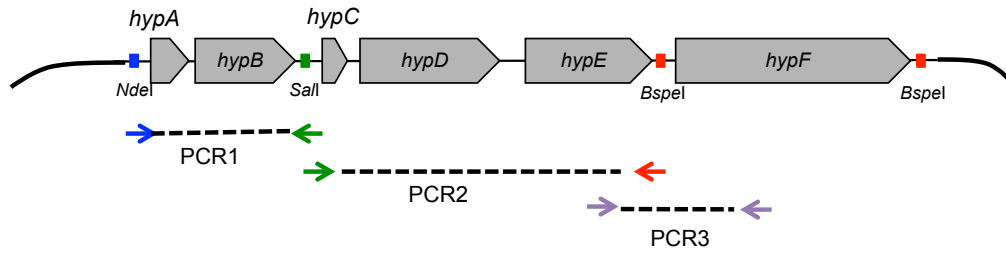
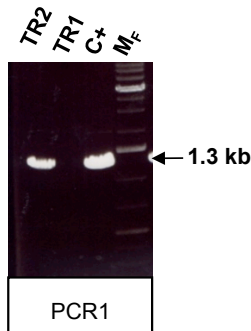
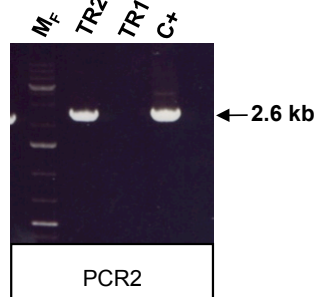
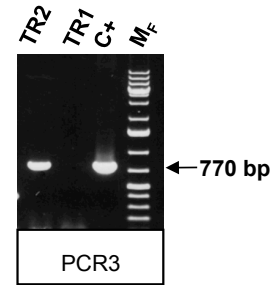
A**pTR-hypABCDE****B****C****D**

Fig. S9. PCR verification of the pTR-*hypABCDE* plasmid. **(A)** Schematic representation of the *hypABCDE* genes (grey boxes) in the pTR-*hypABCDE* plasmid replicating in *E. coli* (lane C+ for positive control) or in the *Synechocystis* mutant designated as TR-*hoxEFUYH-hypABCDE* (TR2). The oligonucleotides primers (supplementary Table S2) used to generate the pTR-*hypABCDE* specific DNA segments (dashed lines) of the following sizes: 1.3 kb (PCR1, panel **B**); 2.6 kb (PCR2, panel **C**) and 770 bp (PCR3, panel **D**) are namely: HypA1NdeIFwd (blue arrow) and HypB1SalIRv (green leftward-pointing arrow) for PCR1; HypCSalIfwdbis (green rightward-pointing arrow) and HypFBspelfwdBis (red arrow) for PCR2; and HypDASSrv (purple leftward-pointing arrow) and HypEASSfwd (purple rightward-pointing arrow) for PCR3. Marker (M_F) = 1Kb plus DNA Ladder (Fermentas). Note that the PCR1-3 reactions can amplify only the adjacent *hypABCDE* genes present in the pTR-*hypABCDE* plasmid, not the chromosomal *hypABCDE* genes because they are located too far away from each others (see supplementary Fig. S1 and Fig. S8). This explains the absence of PCR products in the negative-control *Synechocystis* strain TR1 (the TR-*hoxEFUYH* mutant), which lacks pTR-*hypABCDE*.

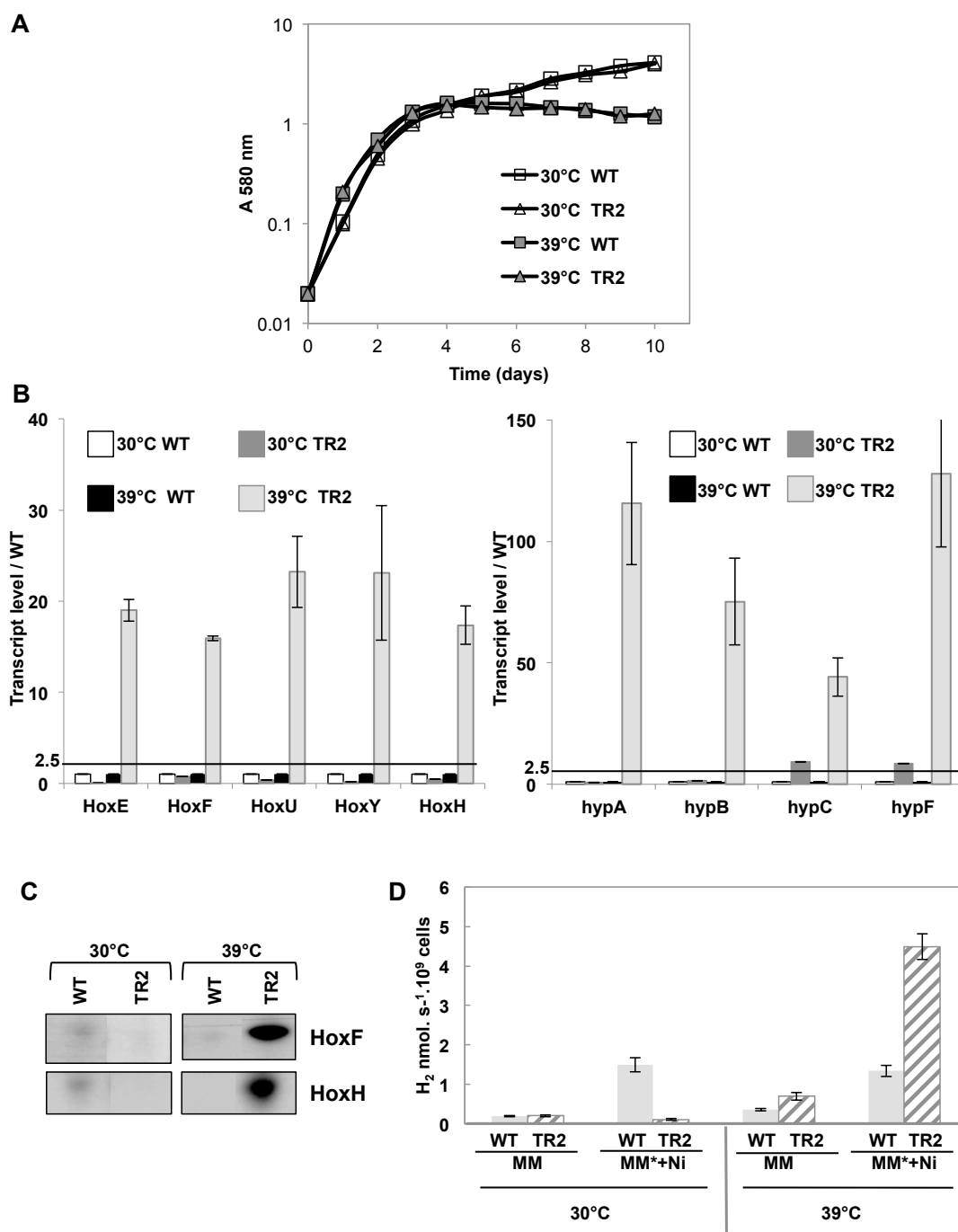


Fig. S10. Confirmation of the temperature-controlled high-level expression of the *hoxEFUYH* operon and the *hypABCDEF* genes in the *Synechocystis* mutant TR-*hoxEFUYH-hypABCDEF*. All experiments were performed at least three times on cells grown under standard light at 30°C or 39°C. **(A)** Typical growth of the WT (squares) and TR-*hoxEFUYH-hypABCDEF* (TR2; triangles) at 30°C (white symbols) or 39°C (grey symbols). **(B)** Histogram plot representation of the transcript abundance (measured by Real-time quantitative PCR) of the *hoxEFUYH* operon (left part) and the *hypABCDEF* genes (right part) in WT (white bars) or TR2 (hatched bars) cells. **(C)** Western blot analysis of the abundance of the HoxF and HoxH proteins in WT or TR2 cells. **(D)** Histograms representation of the hydrogenase activities of WT (light grey), or TR2 (hatched bars) growing in standard medium (MM) or MM* (MM + 17 μ M $\text{Fe}(\text{NH}_4)\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) supplemented with 2.5 μ M NiSO_4 .

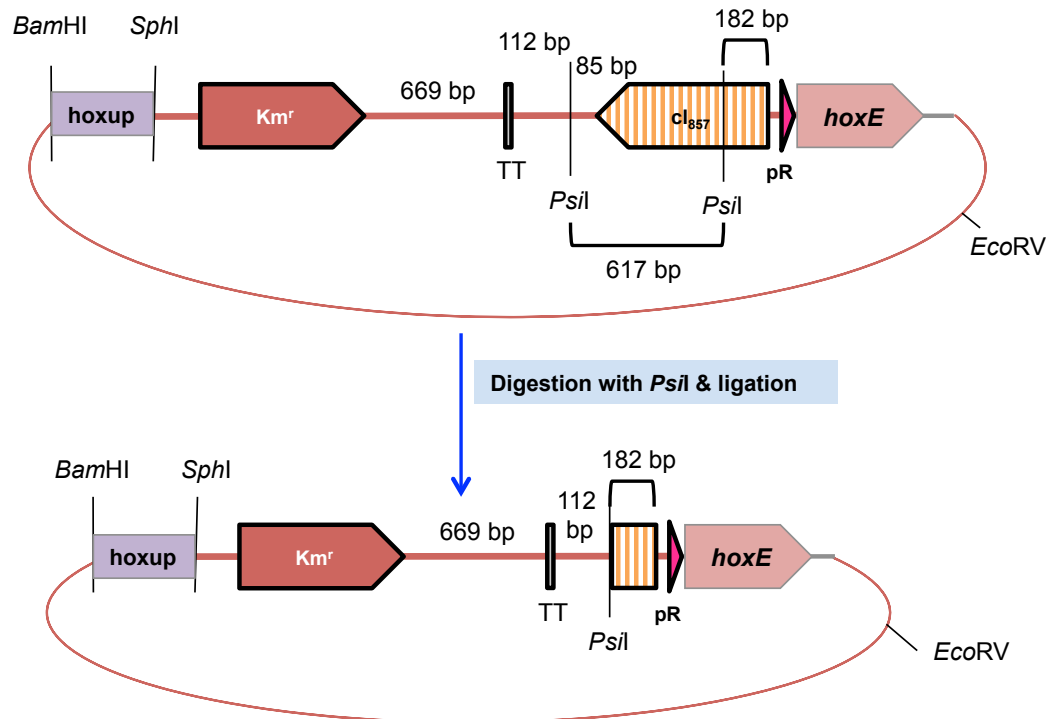


Fig. S11. Construction of the Km^r - λp_R DNA cassette for constitutive strong expression of the *Synechocystis* *hoxEFUYH* operon. The genes are represented by large arrows, while the dark bar indicates the transcription and translation stop signals (TT), which prevent read-through of gene expression from the Km^r marker. The strong λp_R promoter is represented by the red triangle oppositely oriented to the repressor encoding-gene λcI_{857} , which was inactivated by *PstI* restriction during the construction of the Km^r - λp_R DNA cassette. The 252 bp *hoxup* region of DNA upstream of the *hoxEFUYH* operon promoter and the *hoxE* gene, served as platform for homologous recombinations that introduced the Km^r - λp_R DNA cassette in place of the weak natural promoter of the *hoxEFUYH* operon.

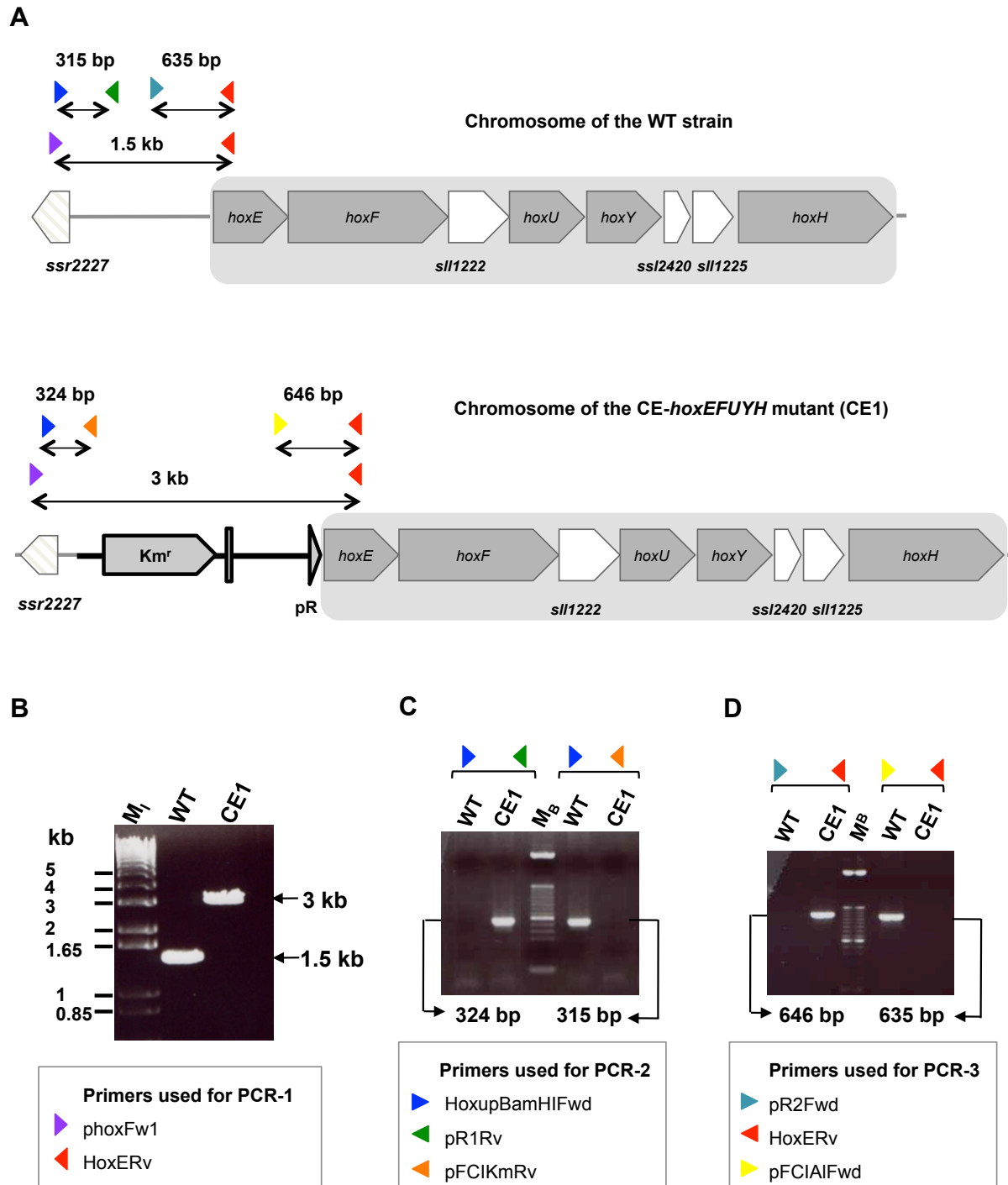


Fig. S12. PCR verification of the CE-*hoxEFUYH* mutant for strong constitutive expression of the *hoxEFUYH* operon. (A) Schematic representation of the *hoxEFUYH* operon in the WT strain or the CE-*hoxEFUYH* mutant (CE1), which harbors the Km^r - λp_R DNA cassette in place of the natural 691 bp-long *hoxEFUYH* promoter region (starting from the first bp upstream of the *hoxE* ATG start codon). The oligonucleotides primers represented by small colored triangles (supplementary Table S2) served for the PCR verifications indicated by double arrows. (B) UV-light image of the agarose gel showing the 1.5 kb and 3.0 kb DNA products of the PCR-1 analysis of the WT strain or the CE1 mutant. Marker (M_I) = 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). (C) PCR-2 and (D) PCR-3 confirmation that CE1 mutant cells contain only CE1 mutant (no WT) chromosomes. Marker (M_B) = 1Kb plus DNA Ladder (Biolabs).

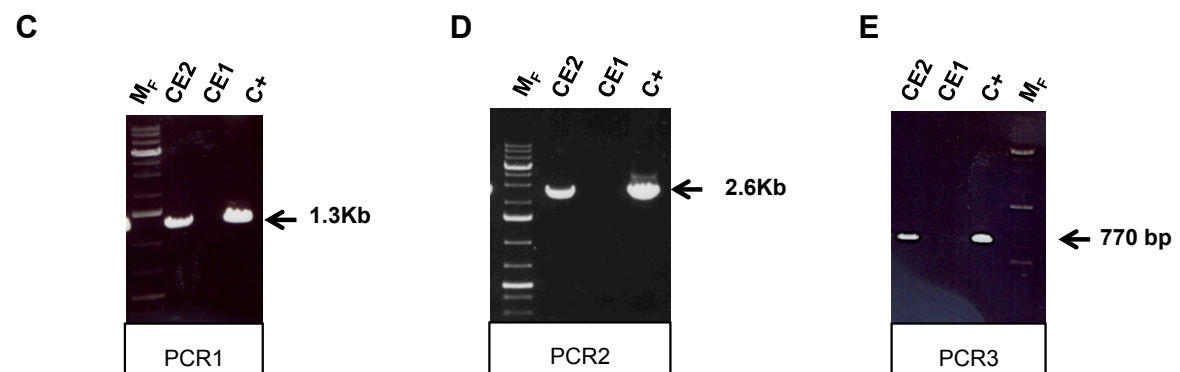
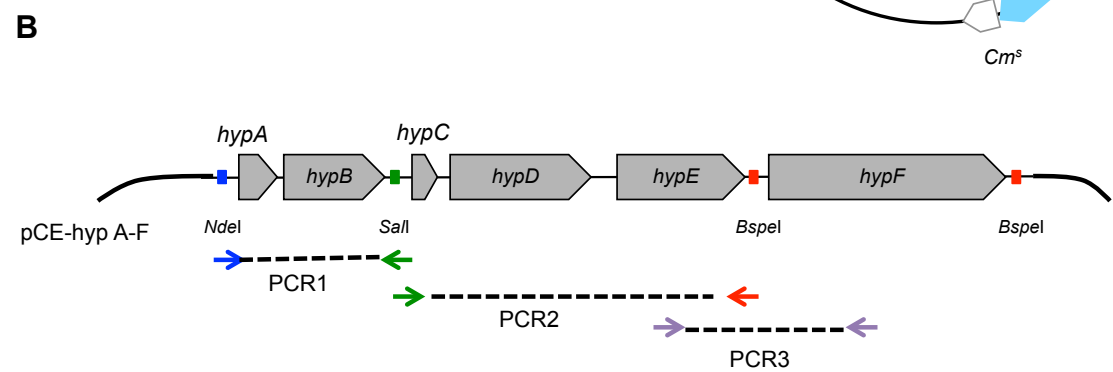
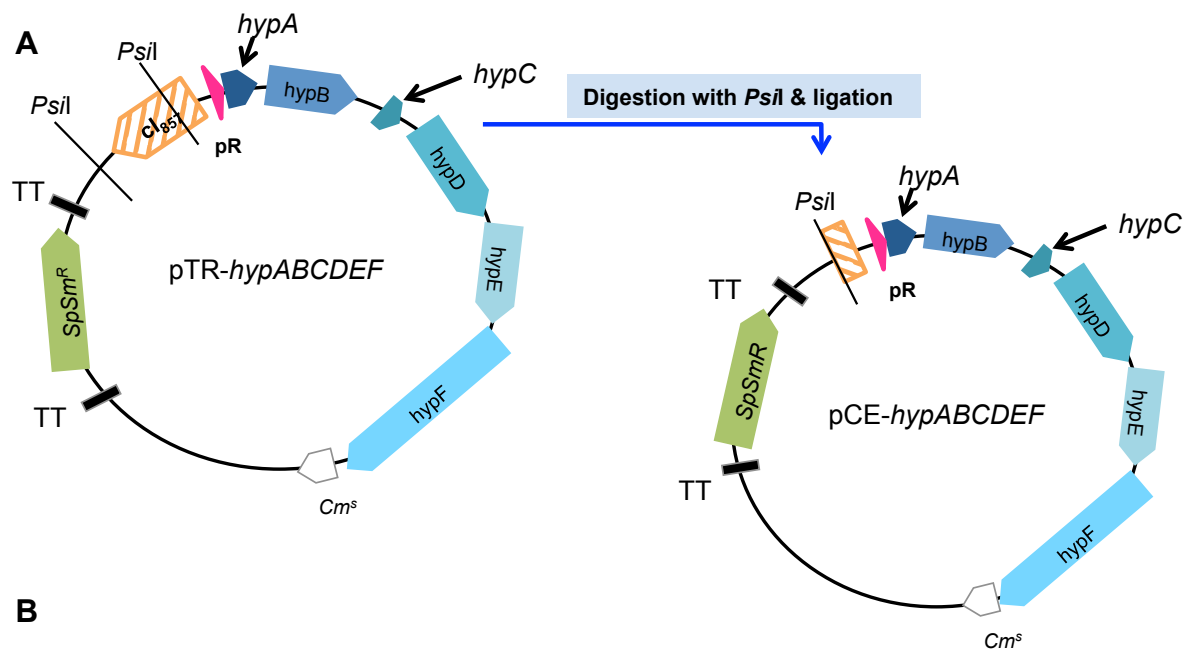


Fig. S13. (A) Construction of the pCE-*hypABCDEF* plasmid for constitutive strong expression of the *hypABCDEF* genes. pCE-*hypABCDEF* was generated after the *PsiI* cleavage and religation of the pTR-*hypABCDEF* plasmid to inactivate the λ CI₈₅₇ repressor gene, which normally controls the strong λp_R promoter (red triangle). The genes are represented by large arrows, while the transcription and translation stop signals (TT) are indicated by dark grey bars. (B) Schematic representation of the *hypABCDEF* genes in the pCE-*hypABCDEF* plasmid replicating in *E. coli* (lane C+ for positive control) or in the *Synechocystis* mutant designated as CE-*hoxEFUYH-hypABCDEF* (CE2). The oligonucleotides primers (supplementary Table S2) used to generate the pCE-*hypABCDEF* specific DNA segments (dashed lines) of the following sizes: 1.3 kb (PCR1, panel B); 2.6 kb (PCR2, panel C) and 770 bp (PCR3, panel D) are namely: HypA1NdeIFwd (blue arrow) and HypB1SalIRv (green leftward-pointing arrow) for PCR1; HypCSalIfwdbis (green rightward-pointing arrow) and HypFBspelfwdbis (red arrow) for PCR2; and HypDASSrv (purple leftward-pointing arrow) and HypEASSRwd (purple rightward-pointing arrow) for PCR3. Marker (M_F) = 1Kb plus DNA Ladder (Fermentas). Note that the PCR1-3 reactions can amplify only the adjacent *hypABCDEF* genes present in the pCE-*hypABCDEF* plasmid, not the chromosomal *hypABCDEF* genes because they are located too far away from each others (see supplementary Fig. S1 and Fig. S8). This explains the absence of PCR products in the negative-control *Synechocystis* strain CE1 (the CE-*hoxEFUYH* mutant), which lacks pCE-*hypABCDEF*.

Supplementary Tables

Plasmids	Relevant feature(s)	Reference
Cloning and construction of various cassette		
pGEMT	Amp ^r AT overhang cloning vector	Promega
pUC4K	Source of the Km ^r marker without TT	Pharmacia
pFC1	Replicating plasmid for T ^o -controlled gene expression in <i>Synechocystis</i>	[Mermet-Bouvier, 1994 #30]
pFCIK	pFC1 plasmid where the Sm ^r /Sp ^r marker was replaced by the Km ^r gene of pUC4K to serve as a source of the Km ^r -TT- λ CI ₈₅₇ - λ p _R cassette for T ^o -controlled gene expression	This study Fig S2
Targeted deletion of <i>hoxEFUYH</i> operon in <i>Synechocystis</i>		
pΔhoxEFUYH::Km ^r	pGEMT with the Km ^r -TT- λ CI ₈₅₇ - λ p _R cassette flanked by the upstream and downstream regions of the <i>hoxEFUYH</i> operon.	This study Fig S3
Replacement of the <i>hoxEFUYH</i> operon promoter by the Km ^r -TT- λ CI ₈₅₇ - λ p _R cassette for T ^o -regulated expression		
pTR-HoxEFUYH	pFCIK with the Km ^r -TT- λ CI ₈₅₇ - λ p _R cassette flanked by the <i>Synechocystis</i> hoxup region (-943 to -691 bp upstream of the <i>hoxE</i> ATG start codon) and <i>hoxE</i> CS to serve as platform for homologous recombination mediating promoter replacement	This study Fig. S6
Replacement of the <i>hoxEFUYH</i> operon promoter by the Km ^r -TT- λ p _R cassette for constitutive expression		
pCE-hoxEFUYH	pTR-HoxEFUYH lacking the 617 bp region encompassing a large part (517 bp) of the λ CI ₈₅₇ .	This study Fig S11
Temperature controlled expression of the <i>Synechocystis</i> <i>hypABCDEF</i> genes		
pTR-hypABCDEF	pFCI with the <i>hypABCDEF</i> genes expressed as a single operon under the control of the Sm ^r /Sp ^r -TT- λ CI ₈₅₇ - λ p _R cassette	This study Fig S8
Constitutive high level expression of the <i>hypABCDEF</i> genes in <i>Synechocystis</i>		
pCE-hypABCDEF	pTR-hypABCDEF lacking the 617 bp region encompassing a large part (517 bp) of the λ CI ₈₅₇ .	This study Fig S13

CS, Protein Coding Sequence; Δ, deletion; T^o, temperature; TT, transcriptional terminator

Table S1. Characteristics of the plasmids and strains used in this study

Table S2. Oligonucleotide primers used in this study (voir Annexe)

Hox and hyp proteins detected in soluble proteins from WT or CE2 cells using LC-MS/MS (Orbitrap) technique						
Protein ID in Cyanobase	Name	Mass (kDA)	Number of spectra in WT	Number of spectra in CE2	Unique peptides	Sequence coverage (%)
sll1220	HoxE	18.7	ND	5	4	47
sll1221	HoxF	57.6	ND	32	20	54
sll1222		24.1	ND	9	7	44
sll1223	HoxU	26.1	ND	16	11	56
sll1224	HoxY	19.9	ND	2	2	23
sll1226	HoxH	52.8	ND	37	23	65
slr1675	HypA1	12.7	ND	6	3	42
sll1432	HypB1	31.1	ND	8	5	26
ssl3580	HypC	8	ND	ND	ND	ND
slr1498	HypD	40	0*	2*	2*	5*
sll1462	HypE	36.4	ND	ND	ND	ND
sll0322	HypF	85.2	ND	3	3	4
Hox and hyp proteins detected in total protein extracts from WT or CE2 cells using LC-MS/MS (Q-Exactive) technique						
Protein ID in Cyanobase	Name	Mass (kDA)	Number of spectra in WT	Number of spectra in CE2	Unique peptides	Sequence coverage (%)
sll1220	HoxE	18.7	1	4	4	39
sll1221	HoxF	57.6	1	36	25	55
sll1222		24.1	0	6	5	30
sll1223	HoxU	26.1	0	14	9	53
sll1224	HoxY	19.9	ND	ND	ND	ND
sll1226	HoxH	52.8	0	24	23	54
slr1675	HypA1	12.7	0	4	4	48
sll1432	HypB1	31.1	0	4	7	26
ssl3580	HypC	8	ND	ND	ND	ND
slr1498	HypD	40	0	2	4	16
sll1462	HypE	36.4	ND	ND	ND	ND
sll0322	HypF	85.2	ND	ND	ND	ND

Table S3. List of the hydrogenase subunits Hox encoded by hox operon, and assembly subunits Hyp in *Synechocystis* WT and CE2 mutant strain growing under standard conditions. ND: Non Detected.

Résultats complémentaires de l'article I

CONSTRUCTION D'UN MUTANT QUI SUREXPRIME L'OPÉRON *HOXEFUYH* ET LE GÈNE *HOXW*

OBJECTIF

Comme décrit précédemment, l'hydrogénase HoxEFUYH de *Synechocystis* est assemblée notamment grâce à un complexe appelé Hyp comprenant six protéines (*HypABCDEF*) qui interviennent dans l'incorporation du cofacteur Ni-Fe du site actif de l'enzyme Hox. Une autre phase de maturation réside dans le clivage du peptide C-terminal de la sous-unité HoxH par une endopeptidase HoxW qui complète le processus de maturation après l'incorporation du centre Ni-Fe. Cette endopeptidase est codée par un gène (*hoxW*) qui se trouve à environ 445 kb de l'opéron *hox* dans le génome de *Synechocystis* (Tamagnini *et al.*, 2007).

Grâce aux résultats précédents, on a pu constater que l'amélioration de la production d'hydrogène chez *Synechocystis* dépend de plusieurs facteurs limitants dont la maturation de l'hydrogénase. Peu d'études ont été faites sur l'endopeptidase HoxW de *Synechocystis*, il semblerait qu'elle clive la sous-unité HoxH à la fin de la séquence consensus DPCLSCSTH en C-terminal de la protéine pour libérer un fragment de 25 acides aminés.

Cette partie de ma thèse vise à améliorer l'activité hydrogénase chez *Synechocystis* grâce à la surexpression des gènes *hoxEFYUH* et du gène *hoxW*, et ainsi définir le rôle du clivage par HoxW dans l'activité hydrogénase et sa tolérance au stress oxydant.

RESULTATS

Sachant que la maturation de l'hydrogénase est importante pour l'augmentation de son activité un mutant qui surexprime à la fois l'opéron *hox* et le gène *hoxW* a été construit (Figure 42).

Pour commencer une cassette d'insertion contenant le gène *hoxW* suivie d'une cassette soit de résistance à la spectinomycine/streptomycine (Sp/Spm^r), soit à la gentamycine (Gm^r) a été construite. Des plateformes d'homologies de la région aval du gène *hoxH* bornent cette cassette de part et d'autre (**Figure 43**). Après transformation dans la souche mutante CE-hoxEFUYH (CE1) qui surexprime l'opéron *hox* à partir d'un promoteur p_R fort et constitutif, le gène codant pour l'endopeptidase HoxW suivie de la cassette de résistance Gm^r ou Sp/Spm^r s'est intégrée par recombinaison homologue en aval de l'opéron *hox*. Ceci permet de surexprimer l'opéron *hox* et le gène *hoxW* (**Figure 42**).

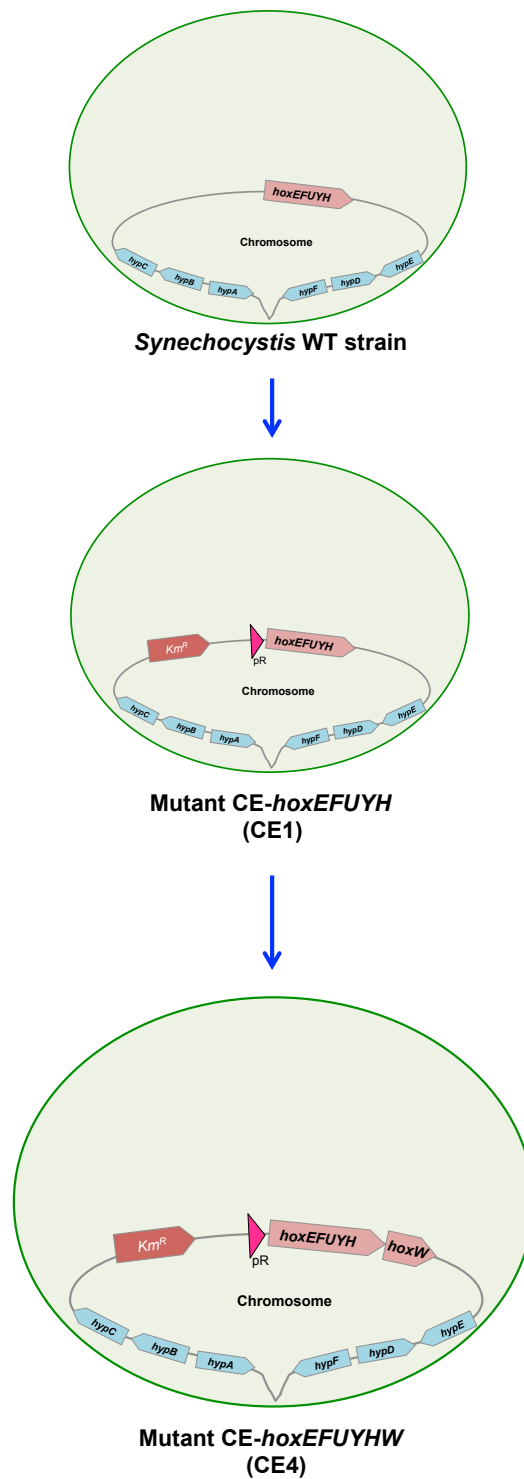


Figure 42 : Schematic representation of the *Synechocystis* wild-type strain (WT; top circle) and the mutants constructed in this study (abbreviated names CE1 or CE4). The *Synechocystis* spherical cells are represented by the green circles. The chromosome is shown as the black line form attached to the cell membrane. The *hoxEFUYH* operon, the *hoxW* gene and the *hypABCDEF* genes and antibiotic resistance markers are shown by large colored arrows, which indicate the direction of their transcription. The red triangle arrow shows the very strong λ pR promoter. The *hoxEFUYH* operon is overexpressed, either alone (CE1) or together with the *hoxW* gene (CE4), constitutively.

Organization of the *Synechocystis* chromosome around the *hoxEFUYH* operon

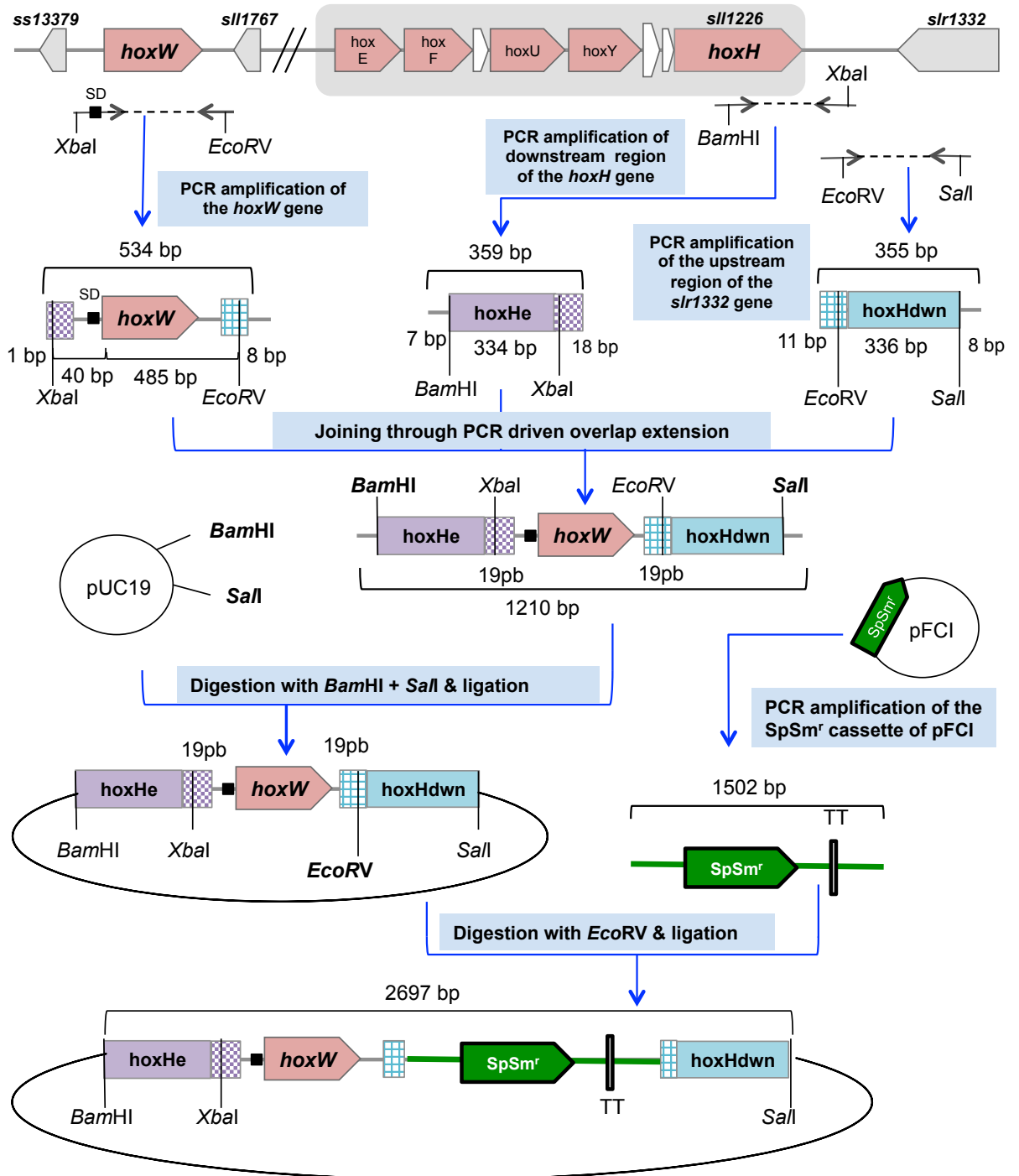


Figure 43 : Construction of the DNA cassette for the incorporation of the *hoxW* gene into the *hoxEFUYH* operon thereby generating the *hoxEFUYHW* operon

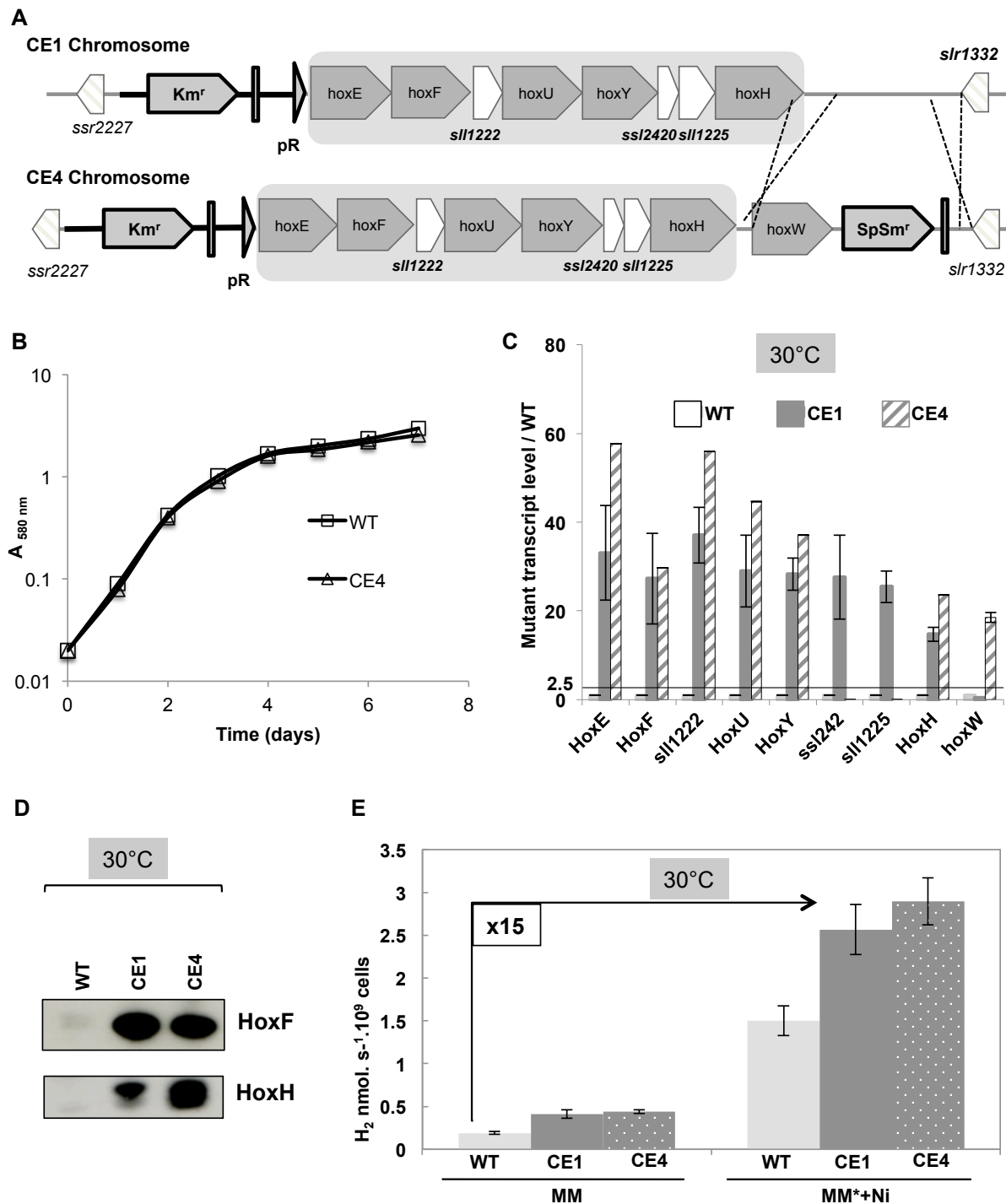


Figure 44 : Analysis of the CE4 mutant (A) Schematic representation of the *hox-operon* chromosome locus in the wild-type (WT) strain and CE4 mutant constructed in this. The genes are represented by boxes pointing into the direction of their transcription. (B) Histogram plot representation of the transcript abundance (measured by Real-time quantitative PCR) of each eight genes of the *hoxEFUYH* operon in WT (white bars), CE11 (grey bars) or CE5 (hatched bars) cells. (C) Western blot analysis of the abundance of the HoxF and HoxH proteins in WT, CE1 or CE4 cells. (D) Histograms representation of the hydrogenase activities of WT (light grey), CE1 (dark grey) or CE4 (dotted bars), growing in standard medium (MM) or MM* (MM + 34 μ M $\text{Fe}(\text{NH}_4)\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) supplemented with 2.5 μ M NiSO_4 .

Par RT-PCR quantitative nous avons confirmé que ce mutant CE4 surexprime l'ensemble des gènes de l'opéron *hox* ainsi que le gène *hoxW* (**Figure 44 panel C**) et cette surexpression n'affecte pas la croissance (**Figure 44 panel B**). Des expériences de Western blot confirment que les protéines HoxF et HoxH sont plus abondantes dans le mutant CE4 que dans la souche sauvage (**Figure 44 panel D**), cependant on observe une augmentation de l'abondance de la protéine HoxH dans la souche CE4 comparée à la souche CE1, ce qui suggère que la protéine HoxW est impliquée de manière directe ou indirecte dans la stabilisation de la sous-unité HoxH.

On peut faire l'hypothèse que HoxH maturée par HoxW est moins soumise à la dégradation en étant stabilisée dans le complexe. En accord avec l'augmentation de transcrit *hoxEFUYHW* et de protéine HoxEFUYHW, la souche CE4 présente une activité 15 fois supérieure en MM* par rapport à la souche WT en MM (**Figure 44 panel E**). Cependant la surexpression de *hoxW* dans un mutant surexprimant seulement les gènes *hoxEFUYH* améliore très peu l'activité hydrogénase ce qui confirme que les facteurs de maturations du centre NiFe sont nécessaires pour obtenir une meilleure activité.

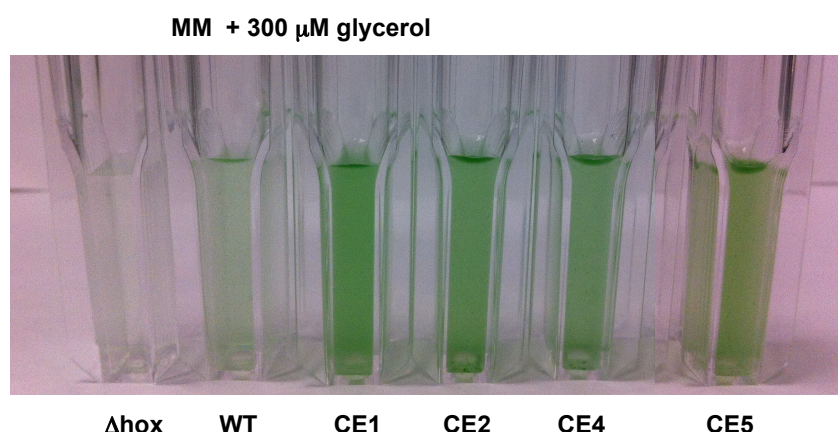


Figure 45 : Influence of the *hoxEFUYH* operon, *hoxW* gene and the *hypABCDE* genes on the growth of *Synechocystis* in the presence of light and glucose or glycerol. Typical growth of the wild-type strains (WT), Δ *hoxEFUYH::Km^r* (Δ hox), CE-*hoxEFUYH* (CE1), CE-*hoxEFUYH-hypABCDE* (CE2), CE-*hoxEFUYHW* (CE4), CE-*hoxEFUYHW-hypABCDE* (CE5). Cells grown twice in MM supplemented with 300 μ M glycerol and incubated under light (3,000 luxes) during 7 days.

La tolérance des souches CE1 et CE4 au stress produit par la croissance en présence de 300 μ M de glycérol en présence de forte lumière a été comparée. Comme l'illustre la figure 44, on peut constater que le mutant CE4 confère une résistance à ce stress oxydant métabolique (si on compare la croissance du WT ou du Δ hox avec CE4). Cependant on n'observe pas de différence significative de croissance entre le mutant CE1 et CE4, de la même manière il n'y a une faible augmentation de l'activité hydrogénase dans le mutant CE4 par rapport au mutant CE1 (Figure 45). Ces résultats sont préliminaires et doivent être confirmés.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'analyse des processus de maturation de l'hydrogénase bidirectionnelle permet d'ouvrir de nouvelles voies pour l'optimisation d'une photo-production chez *Synechocystis*. Elle permet également de mieux comprendre la régulation de l'activité hydrogénase par les voies de maturation, tel que le clivage de la-sous-unité HoxH par l'endopeptidase HoxW. En effet dans le mutant CE4, on constate que l'activité hydrogénase est faiblement augmentée lorsque l'on combine la surexpression des gènes *hoxEFUYH* et *hoxW*. Cependant la surexpression de *hoxW* ne semble pas avoir un rôle pour augmenter la tolérance au stress oxydant, ce qui nous amène à nous interroger sur l'importance de la maturation dans ces conditions. Les cellules de *Synechocystis* soumises à un stress oxydant mettent-elles en place un mécanisme de surexpression des gènes d'assemblage et de maturation, qui rendrait par conséquent non nécessaire la surexpression hétérologue?

Grâce à ce mutant, il serait intéressant de vérifier si l'on accroît l'abondance de sous-unité HoxH maturée lorsque l'on surexprime le gène *hoxW*, et si effectivement ce clivage stabilise directement la sous-unité HoxH. Etudier l'expression du gène *hoxW* dans la souche CE1 dans des conditions oxydantes nous permettrait de savoir si le gène *hoxW* est déjà surexprimé.

Par ailleurs, l'analyse de ce mutant dans d'autres conditions de croissance pourrait nous permettre de mieux comprendre l'importance de ce clivage et trouver d'autres processus dans lequel serait impliquée la protéase HoxW. L'analyse des mutants CE2 (qui surexprime les gènes *hoxEFYUH* et les gènes *hypABCDEFG*) et le mutant CE3 (qui surexprime les gènes *hoxEFYUH* et le gène *hoxW*) montre que la surexpression de l'hydrogénase, son assemblage et sa maturation sont des processus essentiels pour augmenter l'activité hydrogénase. Un mutant qui surexprime les gènes *hoxEFYUH*, les gènes *hypABCDEFG* et le gène *hoxW* nécessite l'élaboration de nombreuses étapes qui permettraient d'optimiser l'efficacité de production d'hydrogène chez *Synechocystis*.

CONSTRUCTION D'UN MUTANT QUI SUREXPRIME L'OPÉRON *HOXEFUYH*, LES GENES *HYPABCDEF* ET LE GENE *HOXW* SIMULTANEMENT

OBJECTIF

Les études sur la maturation de l'hydrogénase qui se font principalement chez *E. coli*, nous ont permis d'obtenir un aperçu global du processus et de mieux comprendre ce mécanisme, néanmoins plusieurs zones d'ombre restent à éclaircir. Les données précédentes confirment clairement que chez *Synechocystis* le système de maturation est essentiel pour avoir une hydrogénase active et par conséquent d'augmenter la production d'hydrogène, puisque la surexpression de l'hydrogénase seule n'est pas suffisante.

Dans cet objectif, construire un mutant qui surexprime les gènes qui codent pour l'hydrogénase : l'opéron *hoxEFUYH* et toute la machinerie d'assemblage de l'hydrogénase : les gènes *hypABCDE* et *hoxW* seraient un challenge fondamental pour maximiser la production d'hydrogène. De plus, l'analyse de ce mutant nous permettrait de mieux comprendre la machinerie de photoproduction et son mécanisme d'assemblage.

RESULTATS

La construction d'un mutant qui surexprime les gènes *hoxEFYUH*, les gènes *hypABCDEF* et le gène *hoxW* a donc été réalisée en introduisant par conjugaison le plasmide pCE-hypA-F qui permet la surexpression constitutive des gènes *hypABCDEF* (construit dans l'article I) dans la souche CE4 qui surexprime les gènes *hoxEFUYHW* (construite dans le chapitre précédent **Figure 43**). Ce mutant appelé CE5 exprime l'opéron *hoxEFUYH* suivi du gène *hoxW* dans le chromosome et les gènes *hypABCDEF* à partir du plasmide pCE-hypA-F qui se réplique chez *Synechocystis* (**Figure 46**).

Les premiers résultats, montrent que dans le mutant CE5 les gènes *hoxEFUYHW* et *hypABCDEF* sont surexprimés en comparaison avec la souche WT et que cette surexpression n'affecte pas la croissance par rapport à la souche WT (**Figure 47 panel A et B**). De même on constate par Western blot que la protéine HoxH est plus abondante dans le mutant CE5 comparé au WT et qu'elle est plus abondante dans le mutant CE5 que dans le mutant CE1 (qui surexprime l'opéron *hoxEFUYH*) et le mutant CE4 (qui surexprime l'opéron *hoxEFUYH* et le gène *hoxW*) (**Figure 47 panel B**). Ceci indique que la maturation du site actif de l'hydrogénase permet une stabilisation de la sous-unité HoxH. Ces résultats sont en accord avec une augmentation de l'activité hydrogénase jusqu'à 20 fois plus importante chez le mutant CE5 en MM* comparée au sauvage en MM (**Figure 47 panel D**). Par ailleurs on remarque que l'activité hydrogénase est 3 fois plus importante chez le mutant CE5 que le WT en MM et MM*.

Des résultats préliminaires du mutant CE5 exposé à un stress oxydant tel que la forte lumière supplémentée de glycérol, semblent indiquer que la souche CE5 est plus résistante que la souche WT et légèrement plus résistante que les souches CE1, CE2 et CE4. Ces résultats révèlent que la tolérance au stress oxydant est améliorée lorsque l'on augmente la quantité d'hydrogénase mais elle est encore plus importante si on surexprime tous les gènes d'assemblage (*hypABCDEF*) et de maturation (*hoxW*) simultanément et pas indépendamment (**Figure 45**).

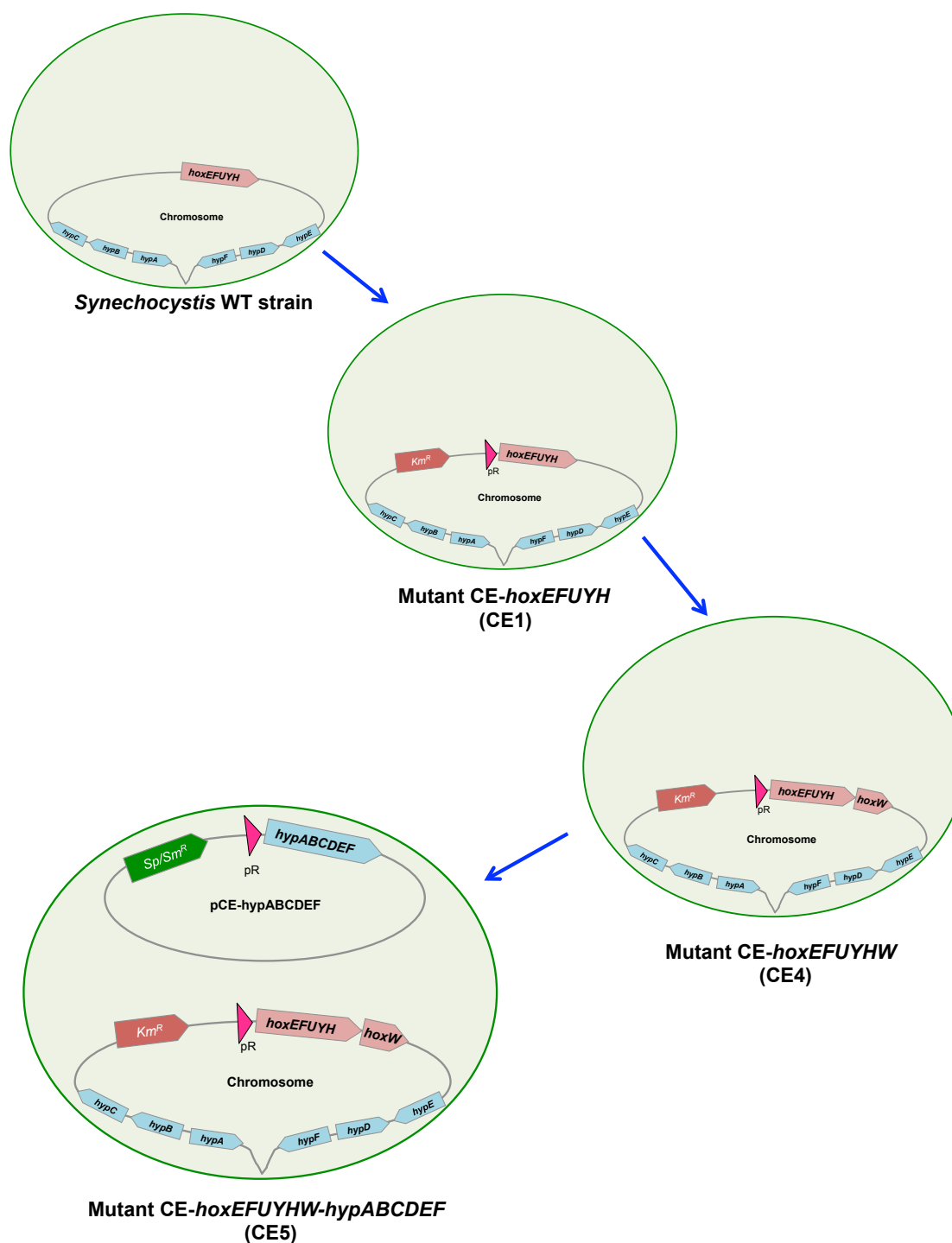


Figure 46 : Schematic representation of the *Synechocystis* wild-type strain (WT; top circle) and the mutants constructed in this study (abbreviated names CE1, CE4 or CE5). The *Synechocystis* spherical cells are represented by the green circles. The chromosome is shown as the black line form attached to the cell membrane, while the *pCE-hypABCDE* replicating plasmid is represented by circles. The *hoxEFUYH* operon, the *hoxW* gene and the *hypABCDE* genes and antibiotic resistance markers are shown by large colored arrows, which indicate the direction of their transcription. The red triangle arrow shows the very strong *lp_R* promoter. The *hoxEFUYH* operon is overexpressed, either alone (CE1) or together with the *hoxW* gene (CE4) or together with the *hypABCDE* genes and the *hoxW* gene (CE5), constitutively.

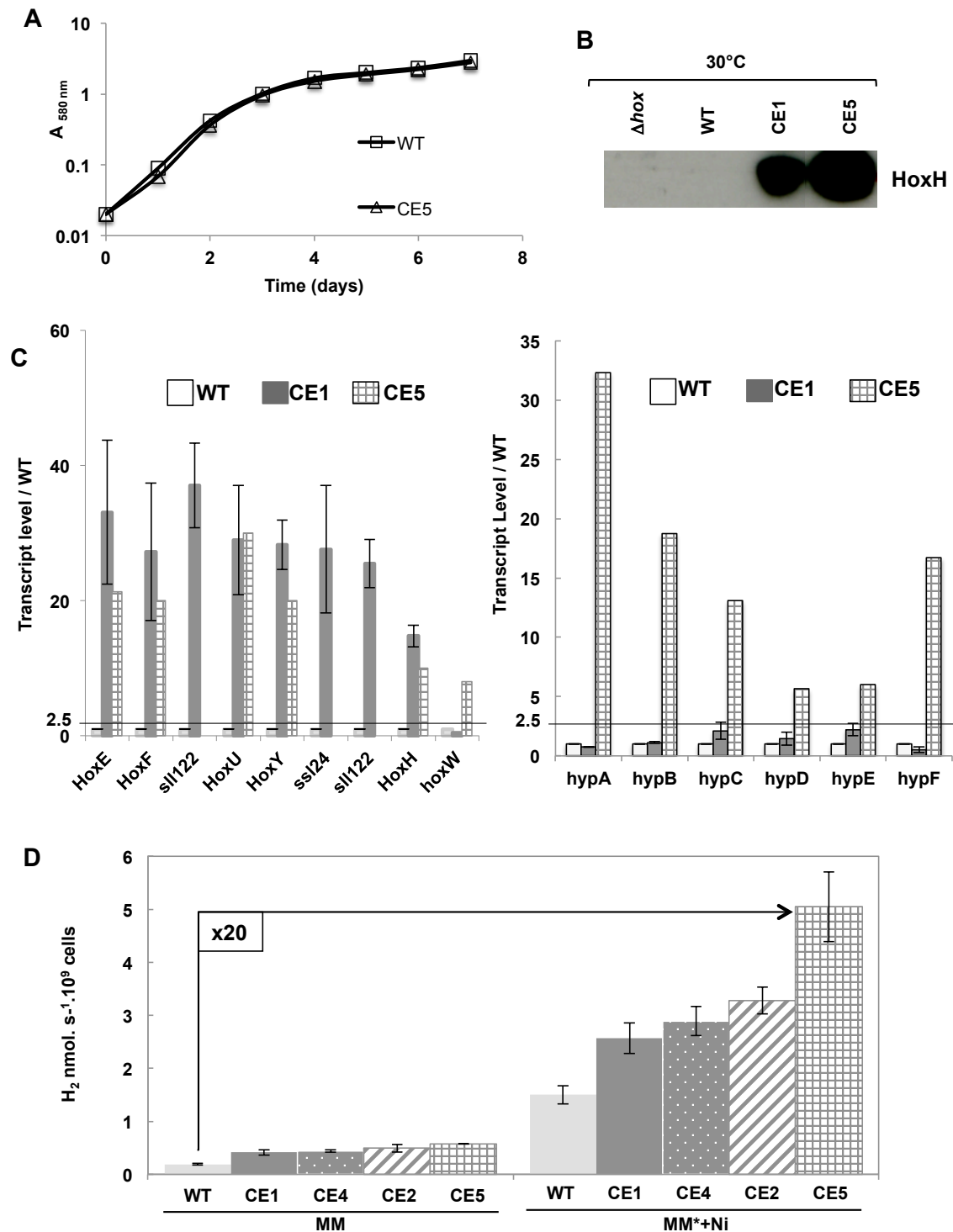


Figure 47 : Analysis of the CE5 mutant. (A) Typical growth of the WT (squares) and CE-*hoxEFUYHW-hypABCDEF* (CE5; triangles) strains. (B) Histogram plot representation of the transcript abundance (measured by Real-time quantitative PCR) of each eight genes of the *hoxEFUYH* operon (left part) and each six *hypABCDEF* genes (right part) in WT (white bars), CE1 (grey bars) or CE5 (cross-hatched bars) cells. (C) Western blot analysis of the abundance of the HoxF and HoxH proteins in Δhox , WT, CE1 or CE5 cells. (D) Histograms representation of the hydrogenase activities of WT (light grey), CE1 (dark grey), CE4 (dotted bars), CE2 (hatched bars) or CE5 (cross-hatched bars) growing in standard medium (MM) or MM* (MM + 34 μM $\text{Fe}(\text{NH}_4)\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) supplemented with 2.5 μM NiSO_4 .

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'hydrogénase pentamérique HoxEFUYH de *Synechocystis* est une enzyme complexe énigmatique dont plusieurs aspects sont encore inexplorés. Pour améliorer la production d'hydrogène chez *Synechocystis*, il est nécessaire de comprendre cette machinerie et par conséquent connaître les gènes qui sont liés à cette hydrogénase. Certains de ces gènes sont connus et font partie des gènes d'assemblage et de maturation de l'enzyme. Par les différents résultats obtenus au cours de cette thèse on a pu démontrer que l'augmentation de l'activité hydrogénase est favorisée par la surproduction de l'hydrogénase, et d'autant plus lorsque l'on surproduit toutes ses protéines de maturation.

Les données préliminaires obtenues dans ce travail restent à confirmer. Par ailleurs, pour mieux identifier le rôle de chaque complexe de maturation, il serait intéressant d'exposer le mutant CE5 à de fortes lumières avec ajout de glucose ou à différentes concentrations d'H₂O₂ comme dans les études précédentes. Tester d'autres conditions de croissance pourrait également apporter des informations sur l'importance de la maturation de l'hydrogénase.

Chez *Synechocystis*, tous les gènes impliqués dans la maturation de l'hydrogénase bidirectionnelle concernent la sous-unité HoxH, or la partie hydrogénase est composée également d'une sous-unité HoxY qui contient un centre [4Fe-4S] qui doit être assemblée en parallèle de la sous-unité HoxH, mais dont aucune étude n'a été faite. Par ailleurs, le complexe HoxEFUYH qui forme l'hydrogénase active est également composé d'une partie diaphorase qui contient plusieurs centres [FeS] et aucune donnée n'est disponible sur la maturation cette partie. L'assemblage de toute l'enzyme Hox est un processus complexe qui fait intervenir de nombreuses sous-unités et plusieurs centres [FeS]. Par conséquent l'assemblage doit faire intervenir d'autres gènes, en plus des gènes impliqués dans la maturation du site actif [NiFe], qui n'ont pas encore été identifiés.

En conclusion pour mieux comprendre les éléments nécessaires à la formation d'une hydrogénase active, connaître les mécanismes de son assemblage et les gènes qui interviennent dans sa maturation est primordiale. Les recherches portant sur de nouvelles voies de maturation et d'assemblage sont en plein développement et pourront répondre à de nombreuses questions concernant l'hydrogénase.

Article II

“The AbrB2 Autorepressor, Expressed from an Atypical Promoter, Represses the Hydrogenase Operon to Regulate Hydrogen Production in *Synechocystis* Strain PCC6803”

OBJECTIF

Pour mieux comprendre le métabolisme de production d'H₂ chez *Synechocystis*, il est nécessaire d'étudier aussi des différents aspects de sa régulation, notamment la régulation transcriptionnelle des gènes *hox* codant pour les sous-unités de l'hydrogénase bidirectionnelle.

Comme décrit dans le chapitre IV, les gènes *hox* de *Synechocystis* sont régulés de manière positive par deux régulateurs transcriptionnels LexA (*sll1626*) et AbrB1 (*sll0359*) (Oliveira and Lindblad, 2009). AbrB1 est une protéine qui fait partie des cyAbrB (« Cyanobacterial AbrB like ») qui sont des régulateurs transcriptionnels dont le domaine AbrB de fixation à l'ADN est situé en C-terminal.

En 2008, des travaux de transcriptomique sur la souche *Synechocystis* glucose tolérante suggérèrent qu'un deuxième régulateur de type cyAbrB (AbrB2, *sll0822*), homologue à AbrB1, serait essentiel à la viabilité cellulaire et pourrait réguler l'opéron *hox* négativement ainsi que son propre promoteur (Ishii and Hihara, 2008).

Dans cet article, nous avons analysé en détail ce régulateur, afin de mieux caractériser son implication dans la régulation de la machinerie de photoproduction d'hydrogène dans la souche sauvage *Synechocystis* naturelle (la souche glucose tolérante possédant de nombreuses mutations qui peuvent altérer l'étude).

RESULTATS

La délétion de la totalité du gène *abrB2* par une cassette de résistance à la kanamycine a permis d'obtenir un mutant (Δ abrB2) dépourvu de toutes les copies du gène *abrB2* dans la souche sauvage de *Synechocystis* (Fig. 1 panels A et B). Contrairement à l'étude d'Ishii and Hihara, la délétion d'*abrB2* n'affecte pas la croissance en conditions standard de croissance et ne montre pas d'altération de pigmentation (Fig. 1 panel C). Ce résultat peut être dû à la différence entre les souches utilisées, mais également au type de délétion puisque dans l'étude d'Ishii and Hihara le remplacement du gène *abrB2* commence 177 pb après le codon ATG start du gène, ce qui peut entraîner la production d'une protéine aberrante toxique dont l'accumulation perturbe le métabolisme.

Des expériences de fusions transcriptionnelles de la région promotrice d'*abrB2* au gène rapporteur *cat* dans la souche sauvage et le mutant Δ abrB2 montrent que l'activité CAT (proportionnelle à la force du promoteur) est augmentée dans le mutant Δ abrB2 ce qui suggère qu'AbrB2 s'auto-réprime (Fig. 3 panel A). Ce résultat est confirmé

par des expériences de retard sur gel après expression et purification de la protéine recombinante His6-AbrB2 qui montrent que la protéine AbrB2 se fixe sur son propre promoteur (Fig. 2).

L'analyse de la séquence promotrice du gène *abrB2* par mutagenèse révèle la présence d'un promoteur atypique avec une boîte -10 étendue qui compense l'absence de boîte -35 (Fig. 3 panels A). On constate que ces caractéristiques sont conservées dans les régions promotrices des gènes *abrB2* chez plusieurs cyanobactéries (Fig. 3 panel B).

Afin d'étudier des variations de la quantité d'AbrB2 dans la régulation des gènes *hox* (Fig. 4 panel A), la souche sauvage a été comparée au mutant Δ abrB2 et à un mutant qui surexprime à partir d'un plasmide et de manière thermorégulée le gène *abrB2* (psll0822) construit dans cette étude. Par des expériences de RT-PCR quantitative et de mesure d'activité hydrogénase, on observe : une augmentation des transcrits des gènes *hox* et de l'activité hydrogénase dans le mutant Δ abrB2 par rapport à la souche WT (Fig. 4 panel B). A contrario le mutant possédant le plasmide psll0822 montre un taux de transcrit *hox* plus faible et une activité hydrogénase diminuée par rapport au WT (Fig. 4 panel D). Ces résultats prouvent qu'AbrB2 agit comme un régulateur négatif de l'opéron *hox* et de l'activité hydrogénase.

Pour confirmer cette régulation, des expériences de fusions transcriptionnelles de la région promotrice des gènes *hox* au gène rapporteur *cat* dans la souche sauvage et le mutant Δ abrB2 ont été effectuées. Ces expériences montrent que l'activité CAT du promoteur des gènes *hox* est faible, ce qui confirme que les gènes *hox* sont exprimés par un faible promoteur. De plus ces expériences confirment qu'AbrB2 régule négativement l'expression des gènes *hox* puisque l'activité CAT du promoteur *hox* dans le mutant Δ abrB2 est augmentée comparée au WT (Fig. 5 panel A).

Des expériences de retard sur gel de la protéine AbrB2 sur différents fragments de la région promotrice de l'opéron *hox* ont été faites pour démontrer le rôle direct d'AbrB2 dans la régulation de l'opéron *hox*. La protéine AbrB2 se fixe sur l'ensemble de la région promotrice des gènes *hox*, ce qui prouve qu'elle agit directement dans la régulation de la transcription des gènes *hox* (Fig. 5 panel B). Cependant, on remarque qu'elle se fixe sur la région promotrice de l'opéron *hox* mais pas sur le promoteur basal, ce qui suggère qu'elle se fixe sur la région promotrice de *hox* par un mécanisme de tige boucle, dont un motif consensus de fixation a été proposé (TT-N₅-AAC) (Fig. 5 panel C).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'étude des mécanismes qui contrôlent l'expression des gènes codant pour l'hydrogénase est importante pour mieux comprendre son rôle et améliorer la production d'hydrogène chez les cyanobactéries.

Les résultats obtenus dans ce travail ont prouvé qu'AbrB2 est un autorégulateur qui s'exprime à partir d'un promoteur atypique possédant une boîte -10 étendue dont la présence n'est pas essentielle à la viabilité cellulaire. De plus, les données obtenues nous ont permis pour la première fois d'étudier de manière détaillée un régulateur négatif agissant sur l'expression des gènes *hox*, en se fixant sur le promoteur de l'opéron *hox* par un mécanisme de tige boucle.

Grâce à toutes ces nouvelles données, un régulateur négatif de l'hydrogénase a pu être caractérisé ainsi qu'une mise à jour de l'architecture de la région promotrice de l'opéron *hox*.

Dans le laboratoire le rôle de ce régulateur a également été analysé par une approche transcriptomique avec des puces oligo qui couvrent l'ensemble du génome (même les plasmides) (Leplat *et al.*, 2013). Les données obtenues montrent que ce régulateur contrôle négativement environ 300 gènes dont un nombre important de gènes portés par des plasmides. Certains de ces gènes sont probablement impliqués dans la production d'hydrogène et construire un mutant qui surexprime constitutivement l'opéron *hox* tels que le mutant CE1 (Article I) combiné à la délétion de ce régulateur négatif pourrait améliorer l'activité hydrogénase.

The AbrB2 Autorepressor, Expressed from an Atypical Promoter, Represses the Hydrogenase Operon To Regulate Hydrogen Production in *Synechocystis* Strain PCC6803

Jérémy Dutheil, Panatda Saenkham, Samer Sakr, Christophe Leplat, Marcia Ortega-Ramos, Hervé Bottin, Laurent Cournac, Corinne Cassier-Chauvat and Franck Chauvat
J. Bacteriol. 2012, 194(19):5423. DOI: 10.1128/JB.00543-12.
Published Ahead of Print 3 August 2012.

Updated information and services can be found at:
<http://jb.asm.org/content/194/19/5423>

SUPPLEMENTAL MATERIAL

These include:

[Supplemental material](#)

REFERENCES

This article cites 52 articles, 14 of which can be accessed free at: <http://jb.asm.org/content/194/19/5423#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), [more»](#)

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Journals.[ASM.org](http://Journals.ASM.org)

The AbrB2 Autorepressor, Expressed from an Atypical Promoter, Represses the Hydrogenase Operon To Regulate Hydrogen Production in *Synechocystis* Strain PCC6803

Jérémy Dutheil,^a Panatda Saenkham,^a Samer Sakr,^a Christophe Leplat,^a Marcia Ortega-Ramos,^a Hervé Bottin,^b Laurentournac,^{c,d,e,*} Corinne Cassier-Chauvat,^a and Franck Chauvat^a

UMR8221, CEA, CNRS, Université Paris Sud, iBiTec-S, LBBC, Gif sur Yvette, France^a; UMR8221, CEA, CNRS, Université Paris Sud, iBiTec-S, LMB, Gif sur Yvette, France^b; CEA, UMR7265, iBEB, LBBBM, CEA-Cadarache, Saint-Paul-lez-Durance, France^c; CNRS, UMR7265, Saint Paul lez Durance, France^d; and Aix Marseille Université, UMR7265, Saint Paul lez Durance, France^e

We have thoroughly investigated the *abrB2* gene (sl0822) encoding an AbrB-like regulator in the wild-type strain of the model cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC6803. We report that *abrB2* is expressed from an active but atypical promoter that possesses an extended -10 element (TGTAATAT) that compensates for the absence of a -35 box. Strengthening the biological significance of these data, we found that the occurrence of an extended -10 promoter box and the absence of a -35 element are two well-conserved features in *abrB2* genes from other cyanobacteria. We also show that AbrB2 is an autorepressor that is dispensable to cell growth under standard laboratory conditions. Furthermore, we demonstrate that AbrB2 also represses the *hox* operon, which encodes the Ni-Fe hydrogenase of biotechnological interest, and that the *hox* operon is weakly expressed even though it possesses the two sequences resembling canonical -10 and -35 promoter boxes. In both the AbrB2-repressed promoters of the *abrB2* gene and the *hox* operon, we found a repeated DNA motif [TT-(N₅)-AAC], which could be involved in AbrB2 repression. Supporting this hypothesis, we found that a TT-to-GG mutation of one of these elements increased the activity of the *abrB2* promoter. We think that our *abrB2*-deleted mutant with increased expression of the *hox* operon and hydrogenase activity, together with the reporter plasmids we constructed to analyze the *abrB2* gene and the *hox* operon, will serve as useful tools to decipher the function and the regulation of hydrogen production in *Synechocystis*.

Cyanobacteria are ancient photoautotrophic prokaryotes that are regarded as the progenitors of oxygenic photosynthesis (33, 39) and the plant chloroplast (8). Over time, cyanobacteria have evolved as the largest and most diverse groups of bacteria (44) and have colonized most waters and soils of our planet. The hardness of cyanobacteria is due to their efficient photosynthesis, which uses nature's most abundant resources, solar energy, water, CO₂, and mineral nutrients, to produce a large part of the atmospheric oxygen and organic assimilates for the food chain (52). On a global scale, cyanobacteria fix an estimated 25 gigatons of carbon from CO₂ per year into energy-dense biomass (37, 49). To perform this huge CO₂ fixation, cyanobacteria use 0.2 to 0.3% (49) of the total solar energy, 178,000 TW, reaching the Earth's surface (22). Thus, the amount of energy passing through cyanobacteria exceeds by more than 25 times the energy demand of human society (about 15 TW), roughly 1,000 times the total nuclear energy produced on Earth.

Furthermore, the availability of molecular tools for gene manipulation make cyanobacteria promising "low-cost" microbial cell factories for the carbon-neutral sustainable production of alkanes (10, 41), bioplastics (1), hydrogen (2, 12), and lipids (25, 43), while saving arable soils for crops (50). In light of their tremendous importance, deeper investigation into the mechanisms by which cyanobacteria convey solar energy to the environment is justified. In this frame, investigating the photobiological production of hydrogen by cyanobacteria has both fundamental and applied research values. As the basic research interest, it addresses the paradox of the antagonistic production of oxygen and hydrogen (O₂ inhibits H₂ production). As a biotechnological interest, it may lead to the sustain-

able production of a high-energy fuel (26), which burns cleanly in producing only water as its by-product.

The pentameric hydrogenase enzyme (HoxEFUYH; Hox for hydrogen oxidation) of cyanobacteria produces H₂ through the reversible reaction $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$, which uses NAD(P)H as the source of electrons originating from photosynthesis and/or sugar catabolism, as well as a nickel-iron cluster and several iron-sulfur centers as redox cofactors (5). The Hox enzyme has been studied mostly in the best-characterized unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* strain PCC6803 (here designated *Synechocystis*), which harbors a small genome (less than 4 Mb [see CyanoBase, <http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/>]) that is easily manipulable (14, 29, 38). The active Hox enzyme, matured by the HoxW protease (47) and assembled using the six-subunit HypABCDEF complex (5), has been recently characterized as a truly bidirectional enzyme with a bias toward H₂ production (30). The five genes *hoxEFUYH* are clustered in a octacistronic operon that also contains three open reading

Received 13 April 2012 Accepted 27 July 2012

Published ahead of print 3 August 2012

Address correspondence to Franck Chauvat, franck.chauvat@cea.fr.

* Present address: Laurentournac, UMR Eco&Sols, IRD, CIRAD, INRA, Supagro, Montpellier, France.

J.D., P.S., and S.S. contributed equally to this work.

Supplemental material for this article may be found at <http://jb.asm.org/>.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JB.00543-12

TABLE 1 Characteristics of plasmids used in this study

Plasmid use and name	Relevant feature(s)	Reference
Targeted deletion of <i>abrB2</i> in <i>Synechocystis</i>		
pGEMT	AT overhang Amp ^r cloning vector	Promega
pUC4K	Source of Km ^r marker gene	Pharmacia
pΔsll0822	pGEMT with <i>Synechocystis</i> sll0822 flanking sequences, with sll0822 coding sequence (from bp 7 to 384) replaced by SmaI site	This study
pΔsll0822::Km ^r	pΔsll0822 with Km ^r marker inserted into unique SmaI site	This study
High-level expression of <i>abrB2</i> in <i>Synechocystis</i>		
pFC1	Replicating plasmid for heat-inducible gene expression in <i>Synechocystis</i>	32
pSll0822	pFC1 with sll0822 CS cloned between NdeI-EcoRI sites	This study
Analysis of <i>hox</i> and <i>abrB2</i> promoters in <i>Synechocystis</i>		
pSB2A	Km ^r Sm ^r /Sp ^r replicative promoter probe plasmid harboring unique SnaBI site in front of its promoterless <i>cat</i> reporter gene	27
pPS1	Km ^r derivative of pSB2A generated after cleavage with NsiI and religation	This study
pJD1	<i>hox</i> PR ^a (bp −794 to +173 relative to TSS) cloned at SnaBI site of pPS1	This study
pJD2	<i>hox</i> PR (bp −522 to +173 relative to TSS) cloned at SnaBI site of pPS1	This study
pJD3	<i>hox</i> PR (bp −403 to +173 relative to TSS) cloned at SnaBI site of pPS1	This study
pJD4	<i>hox</i> PR (bp −170 to +173, relative to TSS) cloned at SnaBI site of pPS1	This study
pPS2	<i>abrB2</i> PR (bp −75 to +88 relative to TSS) cloned at SnaBI site of pSB2A	This study
pPS2 m-8	pPS2 harboring T→G mutation at −8 position relative to TSS	This study
pPS2 m-13	pPS2 harboring T→G mutation at −13 position relative to TSS	This study
pPS2 m-15	pPS2 harboring T→G mutation at −15 position relative to TSS	This study
pPS2 m-4746	pPS2 harboring TT→GG mutation at positions −47 to −46 relative to TSS	This study
Production of AbrB2 in <i>E. coli</i>		
pET14b	Amp ^r <i>E. coli</i> plasmid for production of 6×His-tagged proteins	Novagen
pSS1	pET14b plasmid with sll0822 CS cloned between NdeI and BamHI sites	This study

^a PR, promoter region.

frames of unknown function. This operon is weakly expressed as a polycistronic transcript, which initiates 168 bp upstream of the start codon of the proximal *hoxE* gene (15, 35). The transcriptional regulation of the *hox* operon is complex in responding to various environmental conditions (21), and it involves at least three proteins (36). The LexA-related protein Sll1626, which appears to regulate carbon assimilation rather than DNA repair (9), was found to activate the transcription of the *hox* genes through binding to the promoter of the *hox* operon (15, 35). In addition, two AbrB-like regulators, which have their putative DNA-binding domain in the C-terminal region instead of in the usual N-terminal region, as occurs in other prokaryotes (19), were found to operate in *hox* regulation. In *Bacillus subtilis*, the AbrB regulator is implicated in the regulation of about 100 genes involved in sporulation, biofilm formation, antibiotic production, and development of competence for DNA uptake, but its promoter recognition consensus sequence and mode of interaction with DNA remain unclear (6). In *Synechocystis*, the AbrB1 (Sll0359) protein was found to be indispensable to cell life in the wild-type (WT) strain (34) and the glucose-tolerant mutant (19). Furthermore, AbrB1 was shown to bind to the promoter region of its own gene and to activate transcription of the *hox* operon through binding to the *hox* operon promoter (34). In contrast, AbrB2 (Sll0822) was studied only in the glucose-tolerant strain, which possesses several specific mutations that may interfere, at least indirectly, with the studied process (20). In the glucose-tolerant mutant, AbrB2 appeared to (i) be dispensable to cell life, (ii) bind to the promoter regions of its own gene and of other genes involved in

nitrogen and carbon assimilations (19, 24, 51), and (iii) negatively influence expression of the *hox* operon via an unknown mechanism (19).

In this study, we thoroughly investigated the function and regulation of the *abrB2* gene in the wild-type strain of *Synechocystis*, because it is the organism that actually occurs in nature. We demonstrate that *abrB2* is expressed from an atypical promoter that possesses an extended −10 element to compensate for the absence of a −35 box. Furthermore, we demonstrate through gene deletion and overexpression that AbrB2 represses its own gene, as well as the *hox* operon, which is of biotechnological interest. We think that our *abrB2*-deleted mutant with an improved hydrogenase activity and healthy growth, and also the reporter plasmids we constructed to analyze the promoters of the *abrB2* gene and the *hox* operon, will serve as useful tools to decipher the regulation and the function of the hydrogen production machine in cyanobacteria.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions. *Synechocystis* PCC6803 was grown at 30°C or 39°C (depending on the strain) under continuous white light (2,500 lx, 31.25 μE m^{−2} s^{−1}) on BG11 medium (40) enriched with 3.78 mM Na₂CO₃ (9).

E. coli strains used for gene manipulations (TOP10; Invitrogen), production of recombinant proteins [BL21(DE3); Novagen], or conjugative transfer to *Synechocystis* (CM404; [31]) of replicative plasmids (Table 1) derived from our temperature-controlled expression vector pFC1 (32) were grown on LB medium at 30°C (CM404 and TOP10 harboring pFC1 derivatives) or 37°C [TOP10 and BL21(DE3)]. Antibiotic selection was as follows: for *E. coli*, ampicillin (Ap) at 100 μg ml^{−1} or 50 μg ml^{−1}, kanamycin (Km) at 50 μg ml^{−1}, and spectinomycin (Sp) at 100 μg ml^{−1} for *E.*

coli; for *Synechocystis*, Km at 50 to 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$, Sp at 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, and streptomycin (Sm) at 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Construction of the DNA cassette for targeted deletion of the *Synechocystis* *abrB2* gene. The two regions of *Synechocystis* DNA (each about 300 bp in length) flanking the *abrB2* (sl0822) protein coding sequence (CS) were independently amplified by PCR, using the primers sl0822M-Fw and sl0822R4 for the upstream region and sl0822M-Rv and sl0822A4 for the downstream region (see Table S1 in the supplemental material). These two DNA regions were fused through standard PCR-driven overlap extension (17) in a single DNA segment harboring a SmaI restriction site in place of the *abrB2* CS. After cloning in pGEMT (Table 1), the resulting plasmid was opened at the unique SmaI site, where we cloned the Km^r resistance cassette (a HincII fragment of pUC4K) in the same orientation as the *abrB2* CS it replaced. The resulting $\Delta\text{sl0822::Km}^r$ deletion cassette was verified by PCR and nucleotide sequencing (BigDye kit; ABI, Perkin-Elmer).

Construction of the vector for high-level expression of the *abrB2* gene in *Synechocystis*. Our temperature-controlled expression vector pFC1, which replicates autonomously in *E. coli* and several cyanobacteria (32), was used for high-level expression of the *Synechocystis* *abrB2* gene. pFC1 harbors the λcI857 temperature-sensitive repressor-encoding gene that tightly controls the activity of the otherwise-strong λpR promoter located downstream, which is followed by the λcro ribosome-binding site (5'-AGGA-3') and ATG start codon (in bold) embedded within the unique NdeI restriction site (5'-CATATG-3') for in-frame fusion of protein coding regions. The *abrB2* CS was PCR amplified from *Synechocystis* DNA, using specific primers (sl0822FL1 and sl0822FL2 [see Table S1 in the supplemental material]), which flanked the *abrB2* CS between unique NdeI and EcoRI restriction sites, for cloning into pFC1, opened with the same enzymes. The Smr/Spr resulting plasmid, pSl0822, for high-level expression of *abrB2* at 39°C was verified by PCR and nucleotide sequencing (BigDye kit; ABI Perkin Elmer).

RNA isolation. Aliquots of 200 ml of mid-log-phase cultures (2.5×10^7 cells ml^{-1}) were rapidly harvested by vacuum filtration (less than 1 min), resuspended in 4 ml of 50 mM Tris 50 (pH 8), 5 mM EDTA, immediately frozen in an Eaton press chamber cooled in a dry ice and ethanol bath, and disrupted (250 MPa). RNA was extracted and purified with the Qiagen RNeasy kit as we have previously described (18) and then treated with 20 U of DNase I, RNase-free (Applied Biosystems) for 30 min at 37°C. RNA concentration and purity (A_{260}/A_{280} ratio, >1.9) were determined with a Nanodrop apparatus (Thermo Scientific) and migration on an agarose gel to verify the absence of RNA degradation. The absence of contaminant DNA was verified with the Taq DNA-dependent DNA polymerase (Invitrogen) using primers specific to the control gene *rnpB* (see Table S1 in the supplemental material).

RT-PCR and quantitative PCR. cDNAs were synthesized from 5 μg of total RNA by using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (RT; Invitrogen). Samples were then incubated for 20 min at 37°C with 4 U RNase H (Applied Biosystems) to eliminate RNA templates, and the cDNA concentration was measured with Nanodrop apparatus adjusted to 1 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ by dilution in H_2O . Quantitative PCR (qPCR) assays of the expression levels of the studied genes and the well-known constitutive control gene *rnpB* (see Table S1 in the supplemental material) were performed with Mesa Green qPCR MasterMix Plus for SYBR assay (RT-SYS2X-03+WOU; Eurogentec) according to the manufacturer's instructions. The gene-specific primers were chosen so as to generate DNA fragments of similar length, between 199 bp and 234 bp. Each reaction was performed in a 50- μl reaction mixture containing 5 ng cDNA, 0.04 μM specific primer, 1 \times Mesa Green qPCR MasterMix Plus buffer, and 2 mM MgCl_2 in an iCycler iQ 96-well reaction plate covered with adhesive film (Bio-Rad). Samples were incubated in an iQ5 multicolor real-time PCR detection system (Bio-Rad) for 2 min at 50°C, 2 min at 95°C, and 45 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Each assay was performed in triplicate, allowing the mean threshold cycle value (C_T) to be calculated from standard curve by using the iQ5 optical system software (Bio-Rad). Each gene-

specific standard curve was made by 4-fold serial dilution of wild-type strain cDNA (ranging from 312.5 to 0.3 ng) compared to the log input cDNA concentration for each primer (data not shown). For each primer tested, the regression value (ΔC_T versus cDNA concentration) was less than 0.1, indicating approximately equal amplification efficiencies. Then, for each studied gene, the C_T value was converted to the gene copy number per ng of template cDNA.

Determination of the TSS of sl0822 by 5'-random amplification of cDNA ends (5'-RACE). Aliquots of 25 μg of total RNAs of the *Synechocystis* WT strain were treated with shrimp alkaline phosphatase (SAP), which does not affect the 5'-triphosphate extremity of full-length mRNAs but dephosphorylates the 5'-monophosphate end of degraded RNA. Then, RNAs were treated with tobacco acid pyrophosphatase (TAP; Epicentre) to convert the 5'-triphosphate extremity of full-length mRNA into the 5'-monophosphate without modifying the 5'-OH end of degraded RNA. The 5'-monophosphate extremity of the full-length mRNAs was ligated to an RNA anchor (see Table S1 in the supplemental material) with the T4 RNA ligase (Invitrogen). The resulting chimeric RNAs were reverse transcribed with SuperScript II (Invitrogen) and the sl0822 gene-specific primer sl0822P1 (see Table S1). This first strand of cDNA was amplified by PCR using both the DNA anchor at the 5' extremity and the sl0822P1 primer at the 3' side. The resulting DNA was sequenced (BigDye kit; ABI Perkin-Elmer) to identify the first sl0822 nucleotide located immediately downstream of the DNA anchor, which is the sl0822 transcription start site (TSS) (see Fig. S1 in the supplemental material).

Construction of transcriptional fusions to the *cat* reporter gene and the CAT assay. The studied promoter regions were amplified by PCR with specific oligonucleotides designed to introduce blunt-ended restriction sites in a way that allowed the elimination of all nucleotide substitutions upon restriction cleavage (see Table S1 in the supplemental material). These promoters were cloned in the unique SnaBI site preceding the promoterless *cat* (chloramphenicol acetyltransferase) reporter gene of our promoter probe vector pSB2A or of its Km^s derivative, pPS1 (Table 1), which replicate in *Synechocystis* with the same copy number as the chromosome (27). Site-directed mutagenesis of the sl0822 promoter was done through standard PCR-driven overlap extension (17) using specific mutagenic primers (see Table S1) and the forward and reverse primers SnaBIFW22 and SnaBIRV22. The sequence of each promoter insert was verified, before and after propagation in *Synechocystis*. Then, 1×10^9 to 2×10^9 cells grown on standard plates to mid-log phase were rapidly harvested and disrupted with a chilled Eaton press prior to CAT assay (28).

AbrB2 production and purification from *E. coli*. The *abrB2* coding sequence was PCR amplified from *Synechocystis* DNA with the primers *abrB2*-NdeI-Fw and *abrB2*-BamHI-Rv (see Table S1 in the supplemental material), digested with both NdeI and BamHI, and cloned into the pET14b plasmid opened with the same enzymes for in-frame fusion to the 6 \times His tag. The resulting plasmid, pSS1 (Table 1), was introduced into *E. coli* BL21(λDE3), which was grown to mid-log phase prior to the addition of 0.5 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 3 h to produce the 6 \times His-AbrB2 protein. Cells were harvested by centrifugation at 7,000 rpm for 5 min at 4°C, suspended in buffer A (30 mM Tris-HCl [pH 7.5], 400 mM NaCl, 20 mM imidazole) containing 2 mg/ml lysozyme (Sigma-Aldrich), and incubated for 1 h on ice. After sonication on ice (6 pulses, 20 s each) and centrifugation (13,000 rpm for 30 min at 4°C), cell lysates were loaded onto a 1 ml Ni-nitrilotriacetic acid-agarose column (Qiagen) preequilibrated with buffer A and washed with 10 bed volumes of 30 mM imidazole in buffer A. The proteins eluted with 300 mM imidazole in buffer A were analyzed by SDS-PAGE. AbrB2-containing fractions were pooled, concentrated with Amicon Ultra centrifugal filter devices (Millipore), diluted in buffer B (30 mM Tris-HCl [pH 7.5], 100 mM NaCl), loaded onto a heparin column (GE Healthcare) preequilibrated with buffer B, and washed with 10 bed volumes of buffer B. AbrB2 was eluted with a linear 0-to-500 mM NaCl gradient in 30 mM Tris (pH 7.5), and the AbrB2-enriched fractions were pooled, concentrated, and stored

in 30 mM Tris (pH 7.5), 400 mM NaCl. AbrB2 protein purity, estimated by SDS-PAGE, was greater than 95%.

Electromobility shift assays (EMSAs). The studied promoter regions were PCR amplified from *Synechocystis* DNA with specific primers (see Table S1 in the supplemental material) purified, 3'-end-labeled with digoxigenin (DIG gel shift kit, 2nd generation; Roche), incubated with AbrB2, migrated on a Novex 6% DNA retardation gel (Invitrogen), blotted on a positively charged nylon membrane (Roche) with a semidry transfer apparatus (Apelex), and cross-linked onto the membrane with a 2-min UV-C (254 nm) exposure (Stratalinker). The DNA bands were revealed with anti-DIG antibodies by chemiluminescence, using Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia) and Kodak developer.

Hydrogenase activity measurements. Hydrogenase activities were measured by two standard methods. First, hydrogen evolution was measured with a modified Clark-type electrode (Hansatech, United Kingdom) (48) as described previously by some of us (46). A total of 2.5×10^7 cells (1-ml culture at an optical density at 580 nm of 1) were harvested by a 5-min centrifugation at 5,000 rpm, resuspended in 25 μ l of 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer, and introduced into 500 μ l of a solution containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM Na-dithionite, and 5 mM methylviologen as the electron donor to hydrogenase. Calibration was performed using the amplitude of the electrical signal from the electrode in the presence of an aliquot of H_2 -saturated water as a concentration reference. Second, hydrogenase activity (the H/D exchange rate of labeled dihydrogen) was determined by membrane-inlet mass spectrometry (MIMS) on cell suspensions, as we have described previously (3, 7).

RESULTS

The *abrB2* gene is dispensable to the viability of the wild-type strain of *Synechocystis*. In the framework of our long-term interest in gene regulation, we have investigated the AbrB2 regulator (Sll0822 in CyanoBase) of the model cyanobacterium *Synechocystis*. Therefore, we constructed the Δ *abrB2*::Km^r deletion cassette (Table 1), in which the complete coding sequence for the 129-amino-acid AbrB2 protein has been deleted and replaced by a transcription terminatorless Km^r marker for selection (Fig. 1A). After transformation in the WT strain of *Synechocystis*, we verified through PCR (Fig. 1B) and DNA sequencing (data not shown) that the Km^r marker had properly replaced the *abrB2* gene in all copies of the polyploid chromosome (13, 23). We also verified through RT-PCR and quantitative RT-PCR that the mutant completely lacked *abrB2* mRNA (data not shown). These data, together with the fact that the Δ *abrB2*::Km^r mutant grows as healthy as the WT strain (Fig. 1C), showed that the AbrB2 protein is dispensable to the growth of *Synechocystis*. This finding is consistent with, but not identical to, the previous observation that the insertion of the Km^r marker at 177 bp downstream of the ATG start codon of *abrB2* (possibly leading to the synthesis of an aberrant protein) did not impair the viability but strongly reduced the growth rate of the glucose-tolerant mutant of *Synechocystis* (19), which has several specific mutations compared to the WT strain (20), i.e., the organism actually occurring in nature.

AbrB2 negatively regulates expression of its own gene through binding to its own promoter. The *Synechocystis* AbrB2 protein was translationally fused to the 6 \times His tag for facile purification from recombinant *E. coli* cells to near homogeneity through nickel affinity chromatography. Then, this 6 \times His-AbrB2 protein was used for an EMSA to determine its ability to bind the DIG-labeled, 163-bp-long promoter region (Fig. 2) shared by the divergently transcribed genes *abrB2* and *slr0846* (Fig. 1). We found that AbrB2 binds on this 163-bp full promoter region, in agreement with a previous observation (19), and on the two sub-

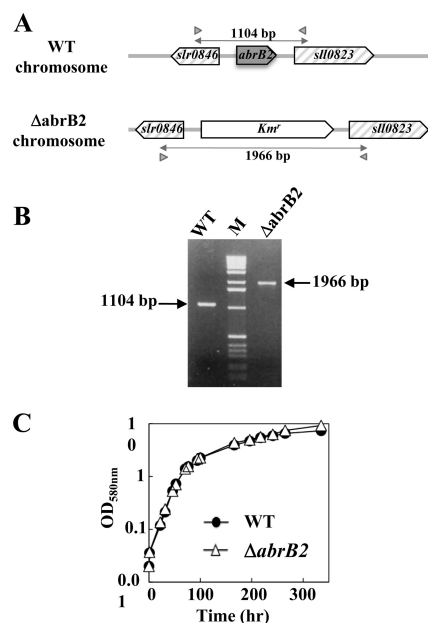


FIG 1 Influence of the AbrB2 regulator on growth of *Synechocystis* under standard conditions. (A) Schematic representation of the *abrB2* chromosome locus in the WT strain (see CyanoBase) and the *abrB2*-deleted mutant (Δ *abrB2*::Km^r) constructed in this study. The genes are represented by boxes pointing in the direction of their transcription. The PCR primers specific to the *slr0846* and *sll0823* genes are represented by the small gray triangles, and the sizes of the products they generated upon amplification of the *abrB2* chromosome locus of the WT (1,104 bp) and *abrB2*-deleted (Δ *abrB2*::Km^r; 1,966 bp) chromosomes are indicated by double arrows. (B) UV light image of the agarose gel, showing the 1,104-bp and 1,966-bp PCR product typical of the WT and *abrB2*-deleted chromosomes, respectively; the results show that the *abrB2*-deleted mutant harbors no WT copies of the chromosome. (C) Growth of the WT strain and the Δ *abrB2* mutant (this experiment was repeated three times and yielded statistical deviations too small to be represented).

fragments tested here (Fig. 2); thus, the promoter region contains several AbrB2-binding motifs (see below). As negative-control experiments, we verified the absence of binding of (i) AbrB2 on a heterologous (noncyanobacterial) DNA (see Fig. S2 in the supplemental material) and (ii) the bovine serum albumin (BSA) protein on the *abrB2* promoter DNA (see Fig. 5B, below; see also Fig. S2 in the supplemental material). The obvious interpretation of the binding of AbrB2 on its own promoter is that AbrB2 is an auto-regulator. To test this hypothesis, we performed a thorough *in vivo* analysis of the *abrB2* promoter by using our promoter probe vector, which harbors the promoterless *cat* reporter gene for promoter analysis and replicates autonomously in *Synechocystis* with a similar copy number as the chromosome (27). We cloned the whole intergenic region (163 bp) between the divergently transcribed genes *abrB2* and *slr0846* in front of the *cat* reporter gene, and we selected the *pabrB2*-*cat* reporter plasmid (pPS2 [Table 1]) expressing the *cat* gene from the *abrB2* promoter. This *pabrB2*-*cat* plasmid (Table 1) was introduced in both the WT strain and our *abrB2* deletion mutant (Δ *abrB2*::Km^r), where it replicated stably, as expected (data not shown). The level of *cat* expression driven by the *abrB2* promoter in the WT strain (44 CAT units [Fig. 3A]) was

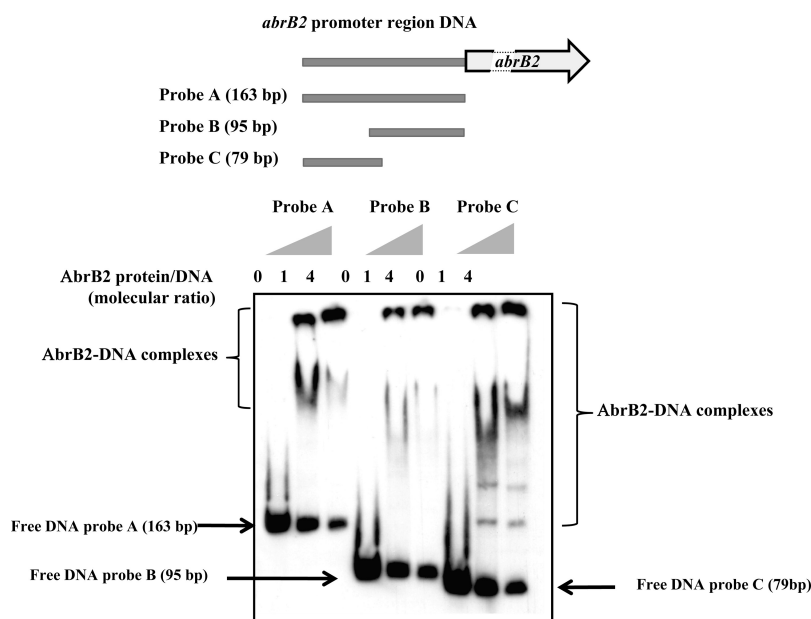


FIG 2 Electrophoretic migration shift assay of binding of the AbrB2 regulator to the promoter region of its own gene. (Top) Schematic representation of the *abrB2* gene, showing its 163-bp promoter region (gray line) and its protein-coding sequence (boxed arrows), which is interrupted (dashed lines) for the sake of size limitation. The positions and sizes of the three DNA fragments of the *abrB2* promoter region used as targets for AbrB2 binding are indicated as probes A, B, and C. (Bottom) Analysis of the electrophoretic mobility of the DIG-labeled segments of the *abrB2* promoter region, following incubation with increasing amounts of purified 6×His-AbrB2 protein. Arrows and regions delineated by braces indicate the positions of the free DNA probes and the retarded DNA-protein complexes, respectively.

similar to that directed by the other promoters we previously analyzed (references 11 and 45 and references therein). This finding indicates that the *abrB2* promoter has an average strength. As the usual control, we verified that the empty promoter probe vector with no promoter insert produced no CAT activity. Very interestingly, the *abrB2* promoter was found to be more active (about 3-fold) in the *abrB2* deletion mutant (131 CAT units), i.e., in the absence of the AbrB2 protein, thereby demonstrating that AbrB2 negatively regulates the expression of its own gene. Collectively, our data unambiguously demonstrate, for the first time, that AbrB2 is an autorepressor.

The core promoter of the *abrB2* gene possesses an “extended –10 element” which compensates for the absence of a –35 box. Using the classical 5′-RACE technique (42), which has performed well in our hands (11, 45), we mapped the TSS of *abrB2*. It is the G nucleotide located 87 bp upstream of the ATG start codon (see Fig. S1 in the supplemental material). Then, we performed a mutational analysis of the *abrB2* promoter to identify its *cis*-acting elements. We studied the 5′-TAatAT-3′ hexamer (lowercase letters indicate nucleotides that are not widely conserved) matching the canonical –10 box of σ^{70} -type *Escherichia coli* promoters (16) with regard to both sequence (5′-TAatAT-3′) and its position (–13 to –8) from the TSS, the above-mentioned G nucleotide we used as the origin of distance (noted as +1 [see Fig. S1 in the supplemental material]). As anticipated, this 5′-TAatAT-3′ *abrB2* element behaves as a –10 promoter box, as it is crucial to trans-

cription. Indeed, transversion mutagenesis of either its presumably important T nucleotides (5′-TAatAT-3′ to 5′-GAatAT-3′ and 5′-TAatAT-3′ to 5′-TAatAG-3′) completely abolished *abrB2* promoter activity (Fig. 3A; reporter plasmids pPS2m-13 and pPS2m-8, respectively), as we previously observed with the –10 box of several *Synechocystis* promoters (references 11 and 45 and references therein). In the *abrB2* promoter, we also noticed the presence of a 5′-TTGAac-3′ motif, resembling a canonical –35 box (16) in sequence (5′-TTGACA-3′) but not position (28 bp instead of 17 ± 1 bp, the usual spacing distance from the –10 box). We mutagenized this 5′-TTGAac-3′ *abrB2* element and found that it was not crucial to promoter activity (Fig. 3A, pPS2m-4746 plasmid), unlike a –35 promoter box. Instead, this *abrB2* 5′-TTGAac-3′ motif appeared to negatively influence the activity of the *abrB2* promoter (Fig. 3A). Then, having in mind that the absence of a –35 promoter box can be compensated by the presence of an “extended –10 box” mediating all contacts with the RNA polymerase σ^{70} factor (4), we mutagenized the upstream T of the presumptive extended –10 box, 5′-TGTAATAT-3′ of the *abrB2* promoter. As anticipated, this mutation (5′-TGTAATA T-3′ to 5′-GGTAATAT-3′) decreased the *abrB2* promoter activity (Fig. 3A, pPS2m-15 plasmid), similarly to what we found in the case of the “extended –10 box” of the *secA* promoter (28). In agreement with its crucial importance for *abrB2* transcription, we found the “extended –10 box,” 5′-TGTAATAT-3′, to be highly conserved in the promoter region of the *abrB2* genes from other cyanobacteria (Fig. 3B). Collectively, our data indicate that the *abrB2* promoter possesses an extended –10 element to compen-

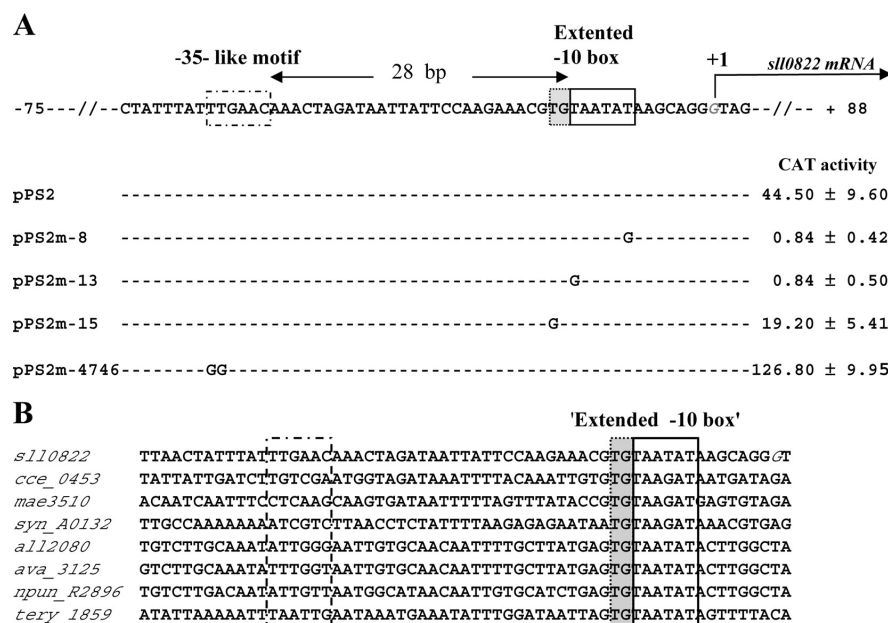


FIG 3 Mutational analysis in *Synechocystis* of the *abrB2* promoter transcriptionally fused to the *cat* reporter gene of our replicative promoter probe vector. (A) Sequence alignment of the nontranscribed DNA strand of the WT (pPS2 reporter plasmid) and mutant (pPS2m reporter plasmids) *abrB2* promoters. Sequence resembling the -35 and extended -10 promoter elements are boxed, and the origin of transcription (+1; G nucleotide in italics) that we mapped in this study (see Fig. S1 in the supplemental material) is indicated by the bent arrow. Nucleotide substitutions in the mutant promoters (m-8, m-13, m-15, and m-4746) are shown in uppercase letters, while the conserved nucleotides are indicated by dashed lines. For each reporter strain, the CAT activity is the mean value of three measurements performed on two independent cellular extracts; 1 CAT unit = 1 nmol of chloramphenicol acetylated/min/mg of protein. (B) Sequence alignments of the *abrB2* promoter regions from various cyanobacteria resembling *Synechocystis* in that their *abrB2* gene is divergently transcribed with an opposite gene. Besides *Synechocystis* PCC6803 (*sl10822*), these cyanobacteria are as follows: *Cyanothece* ATCC51142 (*cce_0453*), *Microcystis aeruginosa* NIES-843 (*mae_35130*), *Nostoc* PCC 7120 (*all2080*), *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (*ava_3125*), *Nostoc punctiforme* PCC 73102 (*npun_R2896*), and *Trichodesmium erythraeum* ISM101 (*tery_1859*). The positions of the conserved extended -10 promoter element and of the nonconserved sequence resembling a -35 element in *Synechocystis* are indicated by boxes.

sate for the absence of a -35 box and that these features are conserved in other cyanobacteria.

AbrB2 negatively regulates both the expression and the hydrogenase activity of the *hoxEFUYH* operon. We used quantitative RT-PCR to analyze the influence of the AbrB2 regulator on the transcript abundance of the eight-gene *hox* operon, namely, *sl1220* (*hoxE*), *sl1221* (*hoxF*), *sl1222*, *sl1223* (*hoxU*), *sl1224* (*hoxY*), *sl1225*, and *sl1226* (*hoxH*). Therefore, total RNAs were isolated from WT and *abrB2*-deleted (Δ *abrB2::Km^r*) cells growing under standard conditions and were subsequently hybridized with the gene-specific RT-PCR primers (see Table S1 in the supplemental material) designed to amplify a segment of each of the eight protein-coding sequences of the *hox* operon (Fig. 4A). All eight transcripts were found to be at least 2.5-fold more abundant in the *abrB2*-deleted mutant than in the WT strain (Fig. 4B). As a negative control, we verified the absence of *abrB2* transcripts in the *abrB2*-deleted mutant (data not shown). Together, these data show that AbrB2 negatively regulates the *hox* operon in WT cells of *Synechocystis*, in agreement with what was observed in the glucose-tolerant mutant (19). From these results one can anticipate that the hydrogenase activity should increase in response to the absence of the AbrB2 regulator. Therefore, we used the two classical methods to measure the level of hydrogenase

activity, which appeared to be at least 2-fold higher in our *abrB2*-deleted mutant than in the WT strain (Fig. 4B), as expected. To confirm that AbrB2 negatively regulates the expression of the *hox* operon and the activity of the hydrogenase in *Synechocystis*, we constructed an *abrB2* overexpression mutant, as follows. We cloned the *abrB2* protein-coding sequence into our temperature-controlled expression vector, pFC1, which replicates autonomously in cyanobacteria and tightly controls the production of the studied protein according to the growth temperatures, i.e., no production at 30°C and strong production after 24 h of induction at 39°C (32, 38). The resulting pSll0822 plasmid was introduced by conjugative transfer in *Synechocystis* cells, which were transferred for 24 h at 39°C to verify the strong induction of *abrB2* expression (27-fold [data not shown]) and the concomitant downregulation (by at least 2-fold) of *hox* expression and hydrogenase activity (Fig. 4C). Collectively, these results demonstrate that AbrB2 negatively regulates expression of the *hox* operon and activity of the hydrogenase in *Synechocystis*.

AbrB2 negatively regulates the activity of the *hox* operon promoter. We used our promoter probe vector to test whether AbrB2 negatively controls the promoter of the *hoxEFUYH* operon. As *Synechocystis* promoters can be complex in harboring several *cis*-acting regulatory elements (references 9 and 45 and

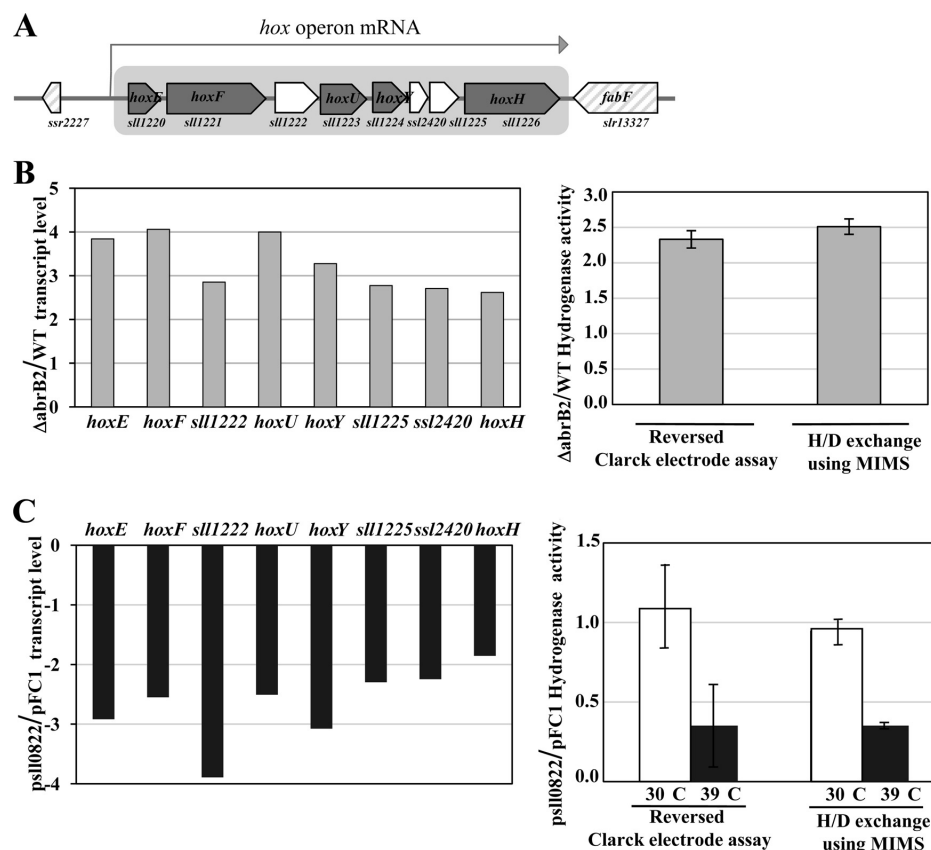


FIG 4 Analysis of expression of the hydrogenase-encoding genes and of hydrogenase activity in various strains of *Synechocystis* harboring a wild-type *abrB2* gene (WT), a deletion of *abrB2* (Δ *ssl0822::Km^r*), a plasmid (*psl0822*) for high-level expression of *abrB2* inducible by 24 h of growth at 39°C, or the empty expression vector (pFC1). All results are expressed as means \pm standard deviations of the data obtained after 3 to 6 biological repetitions of each assay. (A) Schematic representation of the locus of the octacistronic *hox* operon. The genes are represented by boxes pointing in the direction of their transcription; boxes are gray in the case of the *hox* genes. (B, left) Histogram plots of the ratios of transcript abundance (measured by quantitative real-time PCR) of each gene of the octacistronic *hox* operon in the *abrB2*-deleted mutant over the WT strain. (Right) Histogram representation of the hydrogenase activity ratios in Δ *abrB2* over WT cells measured with the MIMS assay and a reversed Clark-type electrode, as indicated. (C, left) Histograms showing the transcript level ratios of each gene of the octacistronic *hox* operon, in cells propagating *psl0822* over those propagating pFC1, which were all grown for 24 h at 39°C prior to qRT-PCR analysis. (Right) Histogram representation of the hydrogenase activity ratios of cells propagating *psl0822* over those propagating pFC1, before (white rectangles) or after (black rectangles) 24 h of growth at 39°C, prior to MIMS and Clark-type electrode assays, as indicated.

references therein), we cloned in our vector the whole *hox* promoter region occurring between the opposite genes *hoxE* and *ssr2227*, along with the first 5 bp of their protein-coding sequences (Fig. 5A). This 967-bp *hox* promoter region extends from -794 to $+173$ nucleotides relative to the transcription start site (the A nucleotide mapped by other workers [15, 35], which we used as the origin of distance). Our *hoxprom-cat* reporter plasmid (pJD1 [Fig. 5A]) weakly expressed the *cat* gene in *Synechocystis* (less than 1 CAT unit), thereby indicating that the *hox* promoter was weakly active, in agreement with the low abundance of *hox* transcripts (34). However, the low activity of the *hox* promoter seemed at variance with the occurrence in this promoter of the two sequences resembling canonical promoter boxes, -35 (TTGtc) and -10 (TAacAa), which are located at correct distances from

each other (18 bp) and from the transcription start site (7 bp). This apparent discrepancy prompted us to speculate that the AbrB2 regulator, which negatively regulates the expression of the *hox* operon (Fig. 4), operates at the level of *hox* promoter activity. To verify this hypothesis, we introduced the *hox-cat* reporter plasmid pJD1 in the *abrB2*-deleted mutant (Δ *abrB2::Km^r*), and *cat* expression was found to be much higher (about 13 CAT units [Fig. 5A]) than in WT cells, as expected.

Then, to meaningfully examine the binding of AbrB2 on the *hox* promoter, we subcloned the long *hox* regulatory region (967 bp) in our promoter probe vector. Then, we serially deleted the 5' end of the *hox* regulatory region while keeping its 3' end intact, because such promoter downstream regions can contain negative *cis*-acting elements (9, 28, 45). As ex-

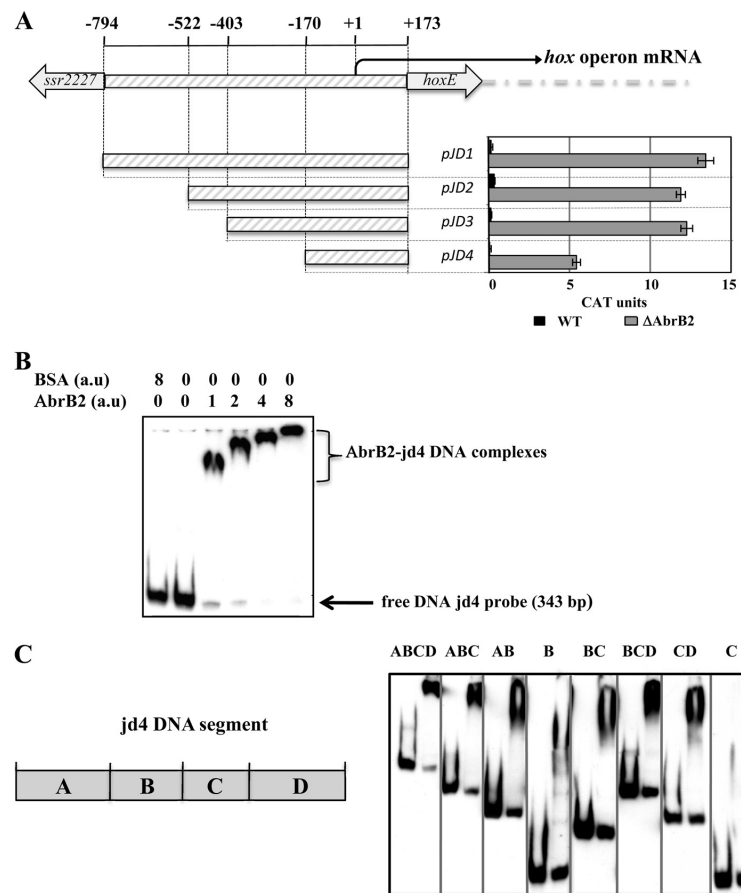


FIG 5 Analysis of the *hoxEFUYH* operon promoter through transcriptional fusion to the *cat* reporter gene and electrophoretic migration shift assay results for binding of the AbrB2 regulator. (A, top) Schematic representation of the *hoxEFUYH* operon promoter region (thick gray lines) located between the *hoxE* protein-coding sequence and the opposite (putative) transposase gene, *ssr2227*. The nucleotide positions within the *hoxEFUYH* operon promoter region are indicated relative to the transcription start site (bent arrow), taken as the origin of distance (noted as +1). For the sake of clarity, the operonic genes downstream of *hoxE* are indicated by the large dashed gray line. (A, bottom) Deletion analysis of the *hox* operon promoter region transcriptionally fused to the *cat* reporter gene of our replicative promoter probe vector. CAT specific activities driven by the resulting reporter plasmids replicating in *Synechocystis* WT or Δ *AbrB2* (hatched gray bars) are expressed in nmol of chloramphenicol acetylated/min/mg of protein. They are the mean values \pm standard deviations calculated from three independent experiments. (B and C) Analysis of the electrophoretic mobility of the DIG-labeled JD4 segment, or subsegments thereof, noted as A, B, C, and D, of the *hox* operon promoter, following incubation with increasing amounts of purified 6 \times His-AbrB2 regulator or the BSA negative-control protein. Arrows and braces indicate the positions of the free DNA probes and the retarded DNA-protein complexes, respectively.

pected, we identified a shorter *hox* regulatory region (343 bp; plasmid pJD4) that retained a promoter activity that was negatively regulated by the AbrB2 protein (i.e., higher in Δ *abrB2*::Km^r cells than WT cells) (Fig. 5A). Together, our data show that AbrB2 negatively regulates the expression of the *hox* operon at the level of its promoter activity.

AbrB2 represses expression of the *hox* operon through binding to its promoter and flanking regions. Using the suitably sized *hox* operon promoter region (343 bp; JD4 DNA) (Fig. 5A), we performed EMSAs to show that AbrB2 binds on the *hox* promoter region (Fig. 5B), as expected. The apparent size of the AbrB2-*hox* retardation complex appeared to increase in parallel with the increase in the molecular ratio of AbrB2 over *hox* DNA, indicating

that several AbrB2 molecules can bind to each *hox* DNA molecule. As the usual controls for specific affinity of AbrB2 for *hox* DNA, we verified the absence of interaction between the *hox* DNA and the BSA control protein and that the abundance of the DIG-labeled *hox*-AbrB2 complex was decreased by the presence of an excess of unlabeled *hox* DNA (see Fig. S2 in the supplemental material).

We also tested the binding of AbrB2 on various segments of the 343-bp JD4 *hox* promoter region in an attempt to better localize the AbrB2-binding sites, and we named the segments A, B, C, and D for the sake of clarity. Fragment A (100 bp) is located upstream of fragment B (74 bp), which harbors the core promoter with the σ -35-like and σ -10-like boxes, followed by the downstream frag-

ments C (69 bp) and D (100 bp), in that order (Fig. 5C). We found that AbrB2 bound to all tested subregions, with the noticeable exception of fragment C alone (Fig. 5C). The occurrence of distant AbrB2-binding regions in the *hox* promoter regions suggests the possible involvement of a DNA looping mechanism in the AbrB2-mediated regulation of *hox* transcription.

DISCUSSION

It is important to thoroughly study the mechanisms controlling the expression of the cyanobacterial genes encoding the Ni-Fe bidirectional hydrogenase in order to better understand its role in the global metabolism of the cell and possibly generate new cell factories for better production of H₂. The pentameric hydrogenase Hox enzyme (HoxEFUYH) is mostly studied in the best-characterized cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. In *Synechocystis*, the five *hox* genes are grouped together with three genes of unknown function in an octacistronic “*hox*” operon (Fig. 4), which generates rare transcripts (5, 36). In the context of our long-term interest in gene expression, we decided to test whether this was due to the weak activity of the *hox* operon promoter. Therefore, we cloned the *hox* promoter region upstream of the promoterless *cat* reporter gene of our promoter probe plasmid vector, which replicates autonomously in *Synechocystis* at the same copy number as the chromosome (27). Our *hoxprom-cat* reporter plasmid (pJD1 [Fig. 5]) directed a very low level of *cat* expression in *Synechocystis* (less than 1 CAT unit), showing, for the first time, that the *hox* promoter is weakly active. This finding is at variance with the occurrence in the *hox* promoter of sequences resembling the canonical −35 (TTGctc) and −10 (TAacAa) promoter boxes (15, 35). Consequently, we speculated that the *hox* promoter might be controlled by a negative regulator. Hence, we became interested in the AbrB2 protein, which resembles the pleiotropic AbrB repressor of *B. subtilis* (6, 19). Working with the glucose-tolerant mutant of *Synechocystis*, which harbors several mutations with unknown physiological consequences (20), it was shown that the disruption of the *sl0822* gene (here, *abrB2*) increased by about 2-fold the abundance of the *hox* transcripts monitored with DNA microarrays (19). Consequently, we decided to test the influence of AbrB2 on the expression and promoter activity of the *hox* operon. For this purpose, we used the wild-type strain of *Synechocystis*, because it is actually this strain that was originally isolated from nature. First, we deleted the *abrB2* gene from all copies of the *Synechocystis* chromosome, which is polyploid (13, 23), and we found that the corresponding mutant grew as well as the wild-type strain (Fig. 1). This result was similar, but not identical, to what was observed in the glucose-tolerant mutant, in which the inactivation of the *abrB2* gene strongly reduced the growth rate (19). This discrepancy might result from the differences in the strains (see above), growth conditions, and/or gene manipulation protocols employed by the two laboratories. While the previous workers introduced the Km^r marker inside the *abrB2*-coding sequence (at 177 bp downstream of the ATG start codon), which might thereby encode an aberrant protein impeding cell growth, we replaced the full *abrB2*-coding sequence with the Km^r marker to preclude the synthesis of AbrB2 (we have verified the absence of the *abrB2* gene [Fig. 1] and its transcripts [data not shown]).

Using our *abrB2*-deleted mutant, we verified through quantitative RT-PCR that the absence of AbrB2 increased (at least 2.5-fold) the transcript abundance of all eight genes of the *hox* operon

(Fig. 4). In agreement, we showed, for the first time, that the amount of active hydrogenase was also increased (about 2-fold) in the absence of AbrB2 (Fig. 4). To confirm these findings, we constructed an *abrB2* overexpression mutant, by cloning the *abrB2* protein-coding sequence into our temperature-controlled expression vector, pFC1, which replicates autonomously in *Synechocystis* and strongly produces the studied protein after 24 h of induction at 39°C (32, 38). As expected, the resulting cells strongly expressed *abrB2* (27-fold more than noninduced cells) and concomitantly downregulated (at least 2-fold) *hox* expression and hydrogenase activity (Fig. 4). Furthermore, we showed that AbrB2 negatively regulated the activity of the *hox* promoter through binding to it (Fig. 5). Together, these novel findings demonstrate unambiguously that AbrB2 represses the *hox* operon. Furthermore, we found distant AbrB2-binding regions in the *hox* promoter region (Fig. 5), thereby suggesting the possible involvement of a DNA looping mechanism in the AbrB2-mediated repression of *hox* transcription. A similar hypothesis has been proposed for LexA-mediated regulation of the *hox* operon (36).

We also studied the expression and the regulation of the *abrB2* gene. First, we mapped its transcription start site (see Fig. S1 in the supplemental material), and we analyzed its promoter through mutations and transcriptional fusions to the promoterless *cat* reporter gene of our promoter probe plasmid vector (27). We report that *abrB2* is expressed from an atypical promoter harboring an extended −10 element (5′-TGTATAAT-3′) that compensates the absence of a −35 box (5′-TTGACA-3′) (Fig. 3), similarly to what we found previously for the *secA* gene (28). Confirming the biological significance of our results, we found the occurrence of an extended −10 promoter element and the absence of a −35 box to be two well-conserved features in the *abrB2* genes from various cyanobacteria (Fig. 3). Also, interestingly, we found the *abrB2* promoter to be about 3-fold more active in the *abrB2* deletion mutant (131 CAT units) than in the WT strain (44 units), thereby demonstrating that AbrB2 negatively regulates expression of its own gene. Furthermore, we verified through EMSA analysis (Fig. 2) that AbrB2 binds on its own promoter, in agreement with a previous observation (19). Collectively, our data demonstrate unambiguously that AbrB2 is an autorepressor that also represses the *hox* operon.

Finally, when looking for a DNA motif that occurs in the *abrB2* promoter and the *hox* promoter subfragments A, B, and D, which all bind AbrB2, but not in the C segment of the *hox* promoter, which does not bind AbrB2, we identified a consensus motif, TT(N₅)AAC, as being possibly involved in AbrB2 binding (see Fig. S2 in the supplemental material). In agreement with this hypothesis, the mutation of the TT(N₅)AAC motif (TTGAACAAAC to GGG AACAAAC), which overlaps the presumptive −35 box of the *abrB2* promoter, appeared to increase (not decrease) the activity of the *abrB2* promoter (Fig. 3).

We believe that our *abrB2*-deleted mutant with an improved hydrogenase activity and also our reporter plasmids for the analysis of the *abrB2* gene and *hox* operon in various host strains with relevant genetic backgrounds will help in deciphering the regulation and the function of the hydrogen production machine, so as to improve it.

ACKNOWLEDGMENTS

J.D. and P.S. were, respectively, recipients of Ph.D. and postdoctoral fellowships from the CEA (France). This work was supported by the

Agence Nationale de la Recherche Grants ANR-09-BIOE-002-01 (EngineeringH2cyano) and the CNRS (Centre National recherche scientifique) Programme Interdisciplinaire Energie PIE2 (Reprogramhydrogen), as well as the Héliobiotec platform, funded by the European Union, Région PACA, French Ministry of Research, and the CEA.

We thank Patrick Carrier and Pierre Richaud for their help in the MIMS analysis of the hydrogenase activity.

REFERENCES

1. Abed RM, Dobretsov S, Sudesh K. 2009. Applications of cyanobacteria in biotechnology. *J. Appl. Microbiol.* 106:1–12.
2. Angermayr SA, Hellingwerf KJ, Lindblad P, de Mattos MJ. 2009. Energy biotechnology with cyanobacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20:257–263.
3. Aubert-Jousset E, Cano M, Guedeney G, Richaud P, Cournac L. 2011. Role of HoxE subunit in *Synechocystis* PCC6803 hydrogenase. *FEBS J.* 278:4035–4043.
4. Barne KA, Bown JA, Busby SJ, Minchin SD. 1997. Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} subunit is responsible for the recognition of the extended-10' motif at promoters. *EMBO J.* 16:4034–4040.
5. Carrieri D, Wawrousek K, Eckert C, Yu J, Maness PC. 2011. The role of the bidirectional hydrogenase in cyanobacteria. *Bioresour. Technol.* 102: 8368–8377.
6. Coles M, et al. 2005. AbrB-like transcription factors assume a swapped hairpin fold that is evolutionarily related to double-psi beta barrels. *Structure* 13:919–928.
7. Cournac L, Guedeney G, Peltier G, Vignais PM. 2004. Sustained photoevolution of molecular hydrogen in a mutant of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 deficient in the type I NADPH-dehydrogenase complex. *J. Bacteriol.* 186:1737–1746.
8. Deusch O, et al. 2008. Genes of cyanobacterial origin in plant nuclear genomes point to a heterocyst-forming plastid ancestor. *Mol. Biol. Evol.* 25:748–761.
9. Domain F, Houot L, Chauvat F, Cassier-Chauvat C. 2004. Function and regulation of the cyanobacterial genes *lexA*, *recA* and *ruvB*: LexA is critical to the survival of cells facing inorganic carbon starvation. *Mol. Microbiol.* 53:65–80.
10. Ducat DC, Way JC, Silver PA. 2011. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends Biotechnol.* 29:95–103.
11. Garcin P, et al. 2012. A transcriptional-switch model for Slr1738-controlled gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis*. *BMC Struct. Biol.* 12:1. doi:10.1186/1472-6807-12-1.
12. Ghirardi ML, Dubini A, Yu J, Maness PC. 2009. Photobiological hydrogen-producing systems. *Chem. Soc. Rev.* 38:52–61.
13. Griese M, Lange C, Soppa J. 2011. Ploidy in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 323:124–131.
14. Grigorieva G, Shestakov S. 1982. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* 13:367–370.
15. Gutekunst K, et al. 2005. LexA regulates the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a transcription activator. *Mol. Microbiol.* 58:810–823.
16. Hawley DK, McClure WR. 1983. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 11:2237–2255.
17. Heckman KL, Pease LR. 2007. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat. Protoc.* 2:924–932.
18. Houot L, et al. 2007. Cadmium triggers an integrated reprogramming of the metabolism of *Synechocystis* PCC6803, under the control of the Slr1738 regulator. *BMC Genomics* 8:350. doi:10.1186/1471-2164-8-350.
19. Ishii A, Hihara Y. 2008. An AbrB-like transcriptional regulator, Slr0822, is essential for the activation of nitrogen-regulated genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* 148:660–670.
20. Kanesaki Y, et al. 2012. Identification of substrain-specific Mutations by massively parallel whole-genome resequencing of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res.* 19:67–79.
21. Kiss E, Kos PB, Vass I. 2009. Transcriptional regulation of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *J. Biotechnol.* 142:31–37.
22. Kruse O, Rupprecht J, Mussnug JH, Dismukes GC, Hankamer B. 2005. Photosynthesis: a blueprint for solar energy capture and biohydrogen production technologies. *Photochem. Photobiol. Sci.* 4:957–970.
23. Labarre J, Chauvat F, Thuriaux P. 1989. Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 171:3449–3457.
24. Lieman-Hurwitz J, et al. 2009. A cyanobacterial AbrB-like protein affects the apparent photosynthetic affinity for CO₂ by modulating low-CO₂-induced gene expression. *Environ. Microbiol.* 11:927–936.
25. Liu X, Fallon S, Sheng J, Curtiss R III. 2011. CO₂-limitation-inducible green recovery of fatty acids from cyanobacterial biomass. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:6905–6908.
26. Maeda T, Sanchez-Torres V, Wood TK. 2008. Metabolic engineering to enhance bacterial hydrogen production. *Microb. Biotechnol.* 1:30–39.
27. Marraccini P, Bulteau S, Cassier-Chauvat C, Mermet-Bouvier P, Chauvat F. 1993. A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of the genera *Synechococcus* and *Synechocystis*. *Plant Mol. Biol.* 23:905–909.
28. Mazouni K, Bulteau S, Cassier-Chauvat C, Chauvat F. 1998. Promoter element spacing controls basal expression and light inducibility of the cyanobacterial *secA* gene. *Mol. Microbiol.* 30:1113–1122.
29. Mazouni K, Domain F, Cassier-Chauvat C, Chauvat F. 2004. Molecular analysis of the key cytotkinetic components of cyanobacteria: FtsZ, ZipN and MinCDE. *Mol. Microbiol.* 52:1145–1158.
30. McIntosh CL, Germer F, Schulz R, Appel J, Jones AK. 2011. The [NiFe]-hydrogenase of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 works bidirectionally with a bias to H₂ production. *J. Am. Chem. Soc.* 133:11308–11319.
31. Mermet-Bouvier P, Cassier-Chauvat C, Marraccini P, Chauvat F. 1993. Transfer and replication of RSF1010-derived plasmids in several cyanobacteria of the genera *Synechocystis* and *Synechococcus*. *Curr. Microbiol.* 27:323–327.
32. Mermet-Bouvier P, Chauvat F. 1994. A conditional expression vector for the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strains PCC6803 and PCC6714 or *Synechococcus* sp. strains PCC7942 and PCC6301. *Curr. Microbiol.* 28:145–148.
33. Mulikidjanian AY, et al. 2006. The cyanobacterial genome core and the origin of photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:13126–13131.
34. Oliveira P, Lindblad P. 2008. An AbrB-Like protein regulates the expression of the bidirectional hydrogenase in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 190:1011–1019.
35. Oliveira P, Lindblad P. 2005. LexA, a transcription regulator binding in the promoter region of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* 251:59–66.
36. Oliveira P, Lindblad P. 2009. Transcriptional regulation of the cyanobacterial bidirectional Hox-hydrogenase. *Dalton Trans.* 2009: 9990–9996.
37. Paumann M, Regelsberger G, Obinger C, Peschek GA. 2005. The bioenergetic role of dioxygen and the terminal oxidase(s) in cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1707:231–253.
38. Poncet M, Cassier-Chauvat C, Leschelle X, Bottin H, Chauvat F. 1998. Targeted deletion and mutational analysis of the essential (2Fe-2S) plant-like ferredoxin in *Synechocystis* PCC6803 by plasmid shuffling. *Mol. Microbiol.* 28:813–821.
39. Rasmussen B, Fletcher IR, Brooks JJ, Kilburn MR. 2008. Reassessing the first appearance of eukaryotes and cyanobacteria. *Nature* 455:1101–1104.
40. Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY. 1979. Generic assignments, strains histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111:1–61.
41. Schirmer A, Rude MA, Li X, Popova E, del Cardayre SB. 2010. Microbial biosynthesis of alkanes. *Science* 329:559–562.
42. Scotto-Lavino E, Du G, Frohman MA. 2006. Amplification of 5' end cDNA with 'new RACE.' *Nat. Protoc.* 1:3056–3061.
43. Sheng J, Vannela R, Rittmann BE. 2011. Evaluation of methods to extract and quantify lipids from *Synechocystis* PCC 6803. *Bioresour. Technol.* 102: 1697–1703.
44. Shi T, Falkowski PG. 2008. Genome evolution in cyanobacteria: the stable core and the variable shell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:2510–2515.
45. Soni B, Houot L, Cassier-Chauvat C, Chauvat F. 2012. Prominent role of the three *Synechocystis* PchR-like regulators in the defense against metal and oxidative stresses. *Open J. Biochem.* 1:1. <http://www.rosscience.org/ojbb/articles/2227-7021-1-1.htm>.
46. Sybirna K, et al. 2008. Shewanella oneidensis: a new and efficient system for expression and maturation of heterologous [Fe-Fe] hydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Biotechnol.* 8:73. doi:10.1186/1472-6750-8-73.

47. Tamagnini P, et al. 2007. Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 31:692–720.
48. Wang R, Healey FP, Myers J. 1971. Amperometric measurement of hydrogen evolution in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.* 48:108–110.
49. Waterbury JB, Watson SW, Guillard RRL, Brand JE. 1979. Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic, cyanobacterium. *Nature* 277:293–294.
50. Williams PG. 2009. Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. *Trends Biotechnol.* 27:45–52.
51. Yamauchi Y, Kaniya Y, Kaneko Y, Hihara Y. 2011. Physiological roles of the *cyAbrB* transcriptional regulator pair Sll0822 and Sll0359 in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 193:3702–3709.
52. Zehr JP. 2011. Nitrogen fixation by marine cyanobacteria. *Trends Microbiol.* 19:162–173.

Article III

“The activity of the *Synechocystis* PCC6803 AbrB2 regulator of hydrogen production can be post-translationally controlled through glutathionylation”

OBJECTIF

Chez les cyanobactéries, plusieurs protéines contiennent des domaines AbrB, certaines constituent un groupe spécifique : les cyAbrB (« Cyanobacterial AbrB like ») dont le domaine de fixation à l'ADN est situé en C-terminal. Ces protéines de types AbrB sont principalement étudiées chez *Bacillus subtilis* (AbrB pour Antibiotic resistance *Bacillus subtilis*). Elles agissent en tant que régulateurs dans des états de transition comme la sporulation qui nécessite des adaptations rapides dues aux changements environnementaux. Comme décrit dans l'article précédent, deux régulateurs homologues du groupe cyAbrB régulent l'expression de l'opéron *hox* : les protéines AbrB1 et AbrB2.

AbrB2 régule négativement des gènes impliqués dans la résistance au stress oxydant et métallique (Leplat *et al.*, 2013). Comme nous l'avons vu précédemment (Article I) la machinerie de photoproduction d'hydrogène agit comme une machine antioxydante qui évacue un excédent d'électrons.

Les cystéines sont souvent des résidus cibles de modifications post-traductionnelles dans des conditions de stress oxydant. Aucune étude sur des modifications post-traductionnelles redox n'a été effectuée sur les protéines de type AbrB chez les cyanobactéries, or la séquence de cyAbrB possède une cystéine conservée dans de nombreuses cyanobactéries.

Cet article vise à caractériser le mode d'action de la protéine AbrB2 dans la régulation des gènes codant pour l'hydrogénase, ainsi que le rôle de la cystéine d'AbrB2 qui pourrait être impliquée dans une modification post-traductionnelle de type glutathionylation.

RESULTATS

Pour mieux caractériser le rôle de cette cystéine, un mutant exprimant dans le chromosome de *Synechocystis* un gène *abrB2*_{C34S} codant une protéine AbrB2 dont la cystéine du gène *abrB2* a été remplacée par une serine (*abrB2*_{C34S}) a été construit (Fig. 1 panel A). Dans le mutant *abrB2*_{C34S} une cassette de résistance à la gentamycine a été introduite à la suite du gène *abrB2* muté, pour comparer cette souche à la souche sauvage sans être affectée par l'expression de la gentamycine. Une cassette gentamycine a été introduite à la suite du gène *abrB2* dans le mutant *abrB2*-Gm^r qui est utilisé comme souche sauvage (Fig. 1 panel A).

Dans les mutants *abrB2-Gm^r* et *abrB2_{C34S}* le niveau de transcrit *abrB2* et la quantité de protéines AbrB2 ont été vérifiées par RT-PCR quantitative et Western Blot respectivement. De plus, par des expériences de dichroïsme circulaire il a été démontré que la mutation de la Cys34S d'AbrB2 n'affecte pas la structure de la protéine (Supplemental Fig. 1 panel A) et n'affecte pas la croissance cellulaire dans les conditions standard de croissance. Ce qui est conforme au fait qu'*abrB2* n'est pas essentiel à la viabilité cellulaire.

AbrB2 est un régulateur négatif de l'opéron *hox* ; pour voir si la cystéine d'AbrB2 joue un rôle dans cette régulation, on a analysé par différentes techniques les mutants *abrB2-Gm^r*, *abrB2_{C34S}* et Δ *abrB2* (souche délétée du gène *abrB2*). Par RT-PCR quantitative sur les gènes de l'opéron *hox*, on observe une quantité de transcrit *hox* intermédiaire dans la souche *abrB2_{C34S}* par rapport à la souche *abrB2-Gm^r* (avec une abondance des transcrit plus faible) et Δ *abrB2* (avec une abondance des transcrit plus importante) (Fig. 1 panel C). Par Western Blot de la sous-unité HoxF on observe le même profil concernant l'abondance de la protéine HoxF (Fig. 1 panel B) et également pour l'activité hydrogénase (Fig. 1 panel D). Ces données montrent que lorsque Cys34 d'AbrB2 est mutée, la répression de l'opéron *hox* est moins importante et donc que la cystéine joue un rôle dans la répression de l'opéron *hox*.

De plus, des analyses transcriptomiques des mutants *abrB2-Gm^r* et *abrB2_{C34S}* comparées à la souche sauvage montrent qu'il y a moins de gènes régulés négativement par le facteur de régulation *abrB2_{C34S}* qu'*abrB2* non muté, ce qui indique que la cystéine joue aussi un rôle dans la répression de nombreux gènes régulés par AbrB2 (Fig. 1 panel E). Une partie des gènes régulés négativement par AbrB2 sont impliqués dans la résistance au stress oxydant et métallique (*norB* qui évacue l'excès d'oxyde nitrique NO, *cydA* accepteur terminal d'électron de la chaîne respiratoire, *feoB* impliqué dans l'import de fer, *coaT* impliqué dans le transport de cobalt, etc.). Par comparaison de la résistance à un stress oxydant de type diamide qui crée des ponts disulfure S-SG ou métallique (nickel) des mutants Δ *abrB2*, *abrB2-Gm^r* et *abrB2_{C34S}*, on remarque que la mutation Cys43S d'AbrB2 augmente la tolérance de *Synechocystis* face à un stress oxydant ou métallique, et que la délétion d'*abrB2* augmente d'autant plus cette tolérance (Fig. 2).

Par des procédés de glutathionylation classique des protéines AbrB2 et *abrB2_{C34S}*, d'analyse par Western Blot contre des anticorps de biotine (BioGSSG) et par comparaison de masse par MALDI-TOF (en collaboration avec P. Decottignis), on a prouvé que la protéine AbrB2 est glutathionylable. De plus, cette modification est réversible après ajout d'agent disulfide réductant (DTT) (Fig. 3). Par contre, la protéine *abrB2_{C34S}* n'est pas glutathionylable, donc la glutathionylation se fait par la cystéine d'AbrB2 (Fig. 3). Par ailleurs, on peut constater que la protéine AbrB1 qui possède une cystéine est également glutathionylable (Fig. 3).

L'effet de la glutathionylation sur la fixation d'AbrB2 sur le promoteur des gènes *hox* a été étudié par des retards sur gel. Les données montrent que la fixation d'AbrB2 sur le promoteur *hox* est similaire à la fixation d'*abrB2_{C34S}*, par contre la fixation d'AbrB2 sur le promoteur *hox* est diminuée en présence de glutathion (Fig. 4). Ces résultats suggèrent que la fixation d'AbrB2 sur le promoteur *hox* est influencée par un encombrement stérique au niveau de la cystéine position 34 et proposent pour la première fois une régulation de l'activité d'un facteur de transcription cyanobactérien par une modification post-traductionnelle de glutathionylation.

Afin d'approfondir le rôle de la cystéine d'AbrB2 dans le métabolisme de *Synechocystis*, des mutants qui surexpriment à partir d'un plasmide et de manière thermorégulée le gène *abrB2* (pFCI-*abrB2*) et *abrB2*_{C34S} (dont la cystéine position 34 du gène *abrB2* a été remplacée par une serine ; pFCI- *abrB2*_{C34S}) ont été analysées. A 30°C, lorsqu'il n'y a pas d'expression du système thermorégulé, les souches qui possèdent le plasmide pFCI-*abrB2* et pFCI- *abrB2*_{C34S} poussent aussi bien que la souche WT. Mais à 39°C, la souche qui possède le plasmide pFCI-*abrB2* ne pousse plus au bout de 24h et les cellules deviennent jaunes (perte du photosystème), comparée à la souche WT et la souche qui possède le plasmide pFCI- *abrB2*_{C34S}, qui ne sont pas affectés dans leur croissance (Supplemental Fig. 4 panel A et B). Ces résultats montrent que l'accumulation d'AbrB2 (Fig. 5) à 39°C affecte la croissance. De plus, la mutation de la cystéine d'AbrB2 abolit la mortalité des cellules qui surexpriment AbrB2 à 39°C, par un procédé inconnu mais qui peut être le résultat de l'expression de nombreux gènes régulés par AbrB2.

La quantité de transcrit du gène *abrB2* est similaire dans les souches qui possèdent le plasmide pFCI-*abrB2* et pFCI- *abrB2*_{C34S}, par contre la quantité de protéine AbrB2 est beaucoup plus importante (avec des formations de dimères) dans la souche qui possède le plasmide pFCI-*abrB2* comparée à la souche qui possède pFCI- *abrB2*_{C34S} (Fig. 5). Les résultats suggèrent que la cystéine joue un rôle dans la stabilité d'AbrB2 à 39°C mais qu'elle n'affecte pas la structure (Supplemental Fig. 2), par ailleurs la forme dimérique semble être impliquée dans la mortalité cellulaire à 39°C.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans cet article nous avons montré que régulateur AbrB2 est impliqué dans la tolérance au stress oxydant et métallique. De plus, l'unique cystéine de la protéine AbrB2 joue un rôle important dans la répression des gènes *hox* et dans la régulation négative des gènes impliqués dans la tolérance au stress oxydant (provoqué par le diamide) et au stress métallique comme par exemple l'atome de nickel. Dans cet article, on démontre que la cystéine peut être glutathionylée ce qui affecte la fixation d'AbrB2 sur le promoteur de l'opéron *hox*. De plus cette cystéine permet une dimérisation des protéines AbrB2 par la création d'un pont disulfure S-S, qui semble être impliquée dans la létalité des cellules à 39°C.

Un modèle de régulation du régulateur AbrB2 est proposé dans cet article : dans les conditions standards de croissance, AbrB2 régule négativement la production d'hydrogène et les défenses contre le stress oxydant. Mais lorsque les cellules sont exposées à un stress oxydant AbrB2 est glutathionylé sur sa cystéine, dans ces conditions AbrB2 ne peut plus réprimer la production d'hydrogène ce qui permet d'évacuer le surplus d'électrons dans la cellule, ainsi que d'autres procédés antioxydants.

Lorsque les cellules ne sont plus soumises à un stress oxydant AbrB2 est déglutathionylé, récupère son activité et peut réprimer la production d'hydrogène et d'autres processus antioxydants qui ne sont plus requis par la cellule.

La glutathionylation est un processus conservé dans l'évolution, cependant il est très peu étudié chez les procaryotes en particulier chez les cyanobactéries. Comprendre

l'influence de la glutathionylation des régulateurs AbrB et leur interaction avec la machinerie de production d'hydrogène permet d'ouvrir de nouvelles voies dans l'amélioration et la compréhension de la photo-production d'hydrogène chez *Synechocystis*.

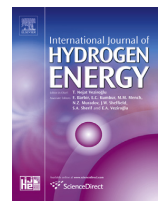
Avec Sam Sakr et Jérémy Dutheil nous avons montré que la protéine AbrB2 pouvait être une cible de la glutathionylation in vitro. Cette modification affecte drastiquement la capacité d'AbrB2 à reconnaître la région promotrice de l'opéron *hox*.

Cette modification post-traductionnelle intervient vraisemblablement pour protéger la Cystéine de la suroxydation irréversible HO·. La glutathionylation pourrait jouer un rôle de « signalling » du stress oxydant. Le régulateur (répresseur) se détache de ses cibles (moins d'affinité en tant que répresseur), ici cela a pour conséquences l'augmentation de l'expression de *hox* mais aussi d'autres gènes sous le contrôle d'AbrB2

C'est la première fois qu'on montre qu'un régulateur transcriptionnel de cyanobactérie est glutathionylable.

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/he

The activity of the *Synechocystis* PGC6803 AbrB2 regulator of hydrogen production can be post-translationally controlled through glutathionylation[☆]

Samer Sakr^{a,1}, Jeremy Dutheil^{a,1}, Panatda Saenkham^a, Hervé Bottin^b,
Christophe Leplat^a, Marcia Ortega-Ramos^a, Jean-Christophe Aude^c,
Violaine Chapuis^d, Genevieve Guedeney^e, Paulette Decottignies^d,
Stéphane Lemaire^f, Corinne Cassier-Chauvat^{a,2}, Franck Chauvat^{a,*,2}

^a UMR8221, CEA, CNRS, Université Paris Sud, iBiTec-S, LBBC, Bat 142 CEA-Saclay, F-91191 Gif sur Yvette Cedex, France

^b UMR8221, CEA, CNRS, Université Paris Sud, iBiTec-S, LMB, Bat 532 CEA-Saclay, F-91191 Gif sur Yvette Cedex, France

^c FRE3377, CEA, CNRS, Université Paris Sud, iBiTec-S, LSOC, Bat 142 CEA-Saclay, F-91191 Gif sur Yvette Cedex, France

^d CNRS, Université Paris-Sud, Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire, UMR8619 Bâtiment 430, Orsay Cedex 91405, France

^e UMR7265, CEA, CNRS, Aix Marseille Université, iBEB, LB3M, CEA-Cadarache, F-13108 Saint-Paul-lez-Durance, France

^f CNRS, Université Pierre et Marie Curie, Institut de Biologie Physico-Chimique, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire des Eucaryotes, FRE3354, 13 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 June 2013

Received in revised form

24 July 2013

Accepted 31 July 2013

Available online 3 September 2013

Keywords:

Hydrogen

ABSTRACT

We show that the *Synechocystis* AbrB2 repressor of hydrogen production, down regulates the defence against oxidative stress. The single widely conserved cysteine of AbrB2 is also shown to play a crucial role in AbrB2 oligomerisation, and in AbrB2-mediated repression of the hydrogenase encoding operon (*hoxEFUYH*) and a wealth of other genes. Very interestingly, our results indicate that this cysteine is the target of glutathionylation, which affects the binding of AbrB2 on the *hox* operon-promoter DNA, as well as the stability of AbrB2 at the non-standard temperature of 39 °C. Similarly, we show that the cysteine of the other *hoxEFUYH* regulator AbrB1 can also be glutathionylated *in vitro*. These novel findings will certainly stimulate the in depth analysis of the influence of glutathionylation on the

[☆] This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

* Corresponding author. Tel.: +33 (0) 1 69 08 35 74; fax: +33 (0) 1 69 08 80 46.

E-mail addresses: sam.sakr@gmail.com (S. Sakr), jeremy.dutheil@enscm.fr (J. Dutheil), saenkham_p@yahoo.com (P. Saenkham), herve.bottin@cea.fr (H. Bottin), christophe.leplat.01@gmail.com (C. Leplat), marcia.ortega-ramos@cea.fr (M. Ortega-Ramos), jean-christophe.aude@cea.fr (J.-C. Aude), violaine.chapuis@u-psud.fr (V. Chapuis), genevieve.guedeney@cea.fr (G. Guedeney), paulette.decottignies@u-psud.fr (P. Decottignies), stephane.lemaire@ibpc.fr (S. Lemaire), corinne.cassier-chauvat@cea.fr (C. Cassier-Chauvat), franck.chauvat@cea.fr (F. Chauvat).

¹ Samer Sakr and Jeremy Dutheil contributed equally to this work.

² Corinne Cassier-Chauvat and Franck Chauvat contributed equally to this work.

0360-3199/\$ – see front matter Copyright © 2013, Hydrogen Energy Publications, LLC. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.124>

Bioproduction
Cyanobacteria
Oxidative stress
Regulation
Cysteine oxidation

production of hydrogen, a field totally overlooked so far. They also emphasize on the evolutionary conservation of glutathionylation, a process mostly described in eukaryotes, so far.

Copyright © 2013, Hydrogen Energy Publications, LLC. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cyanobacteria, the only known prokaryotes capable of oxygenic photosynthesis, are attractive organisms for the sustainable production of the clean fuel hydrogen [1], due to their (i) simple nutritional requirements, (ii) effective metabolism, and (iv) the powerful genetics of some species. This is the case of *Synechocystis* sp. PCC6803 (hereafter *Synechocystis*), the unicellular cyanobacterium that possesses a small genome (about 4 Mb; CyanoBase: <http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>) easily manipulable [2–4]. This is important to improve the production and activity of the hydrogen-producing machine. In *Synechocystis*, the pentameric hydrogenase complex HoxEFUYH, correctly matured and assembled, uses the electrons provided by the NAD(P)H originating from photosynthesis and/or sugar catabolism to produce hydrogen [1]. The *hoxEFUYH* operon is weakly expressed [5], under the positive control of the LexA (Sll1626; in CyanoBase) [6,7] and AbrB1 (Sll0359) [8] regulators, and the negative regulation of the AbrB2 (Sll0822) protein [9] that represses the *hoxEFUYH* operon [5]. It is important to study the regulation of hydrogen production, in order to better understand its role in the metabolism of cyanobacteria and subsequently develop powerful strategies to enhance the photoproduction of H₂.

All 129 fully-sequenced cyanobacterial genomes [10] possess at least one AbrB-encoding gene, which define three paralogous clades, clades A and B, and a clade specific to marine cyanobacteria [11]. Like their bacterial counterparts, which regulate sporulation, biofilm formation, antibiotic resistance, etc [12], cyanobacterial AbrB regulators operate in many cellular processes. They were shown to bind to the upstream region of the Rubisco-encoding *rbc* operon in *Synechococcus* PCC7002 [13]; the *Anabaena* PCC7120 *sodB* (iron superoxide dismutase) and *hypC* (hydrogen production) genes [14,15]; and the hepatotoxin synthesis gene *aoaC* in *Aphanizomenon ovalisporum* [16,17]. In *Synechocystis* PCC6803, the clade A protein AbrB1 (Sll0359) was shown to be indispensable to cell life and to bind to the promoter regions of its own gene and of the *hoxEFUYH* hydrogenase operon [8,9]. The clade B protein AbrB2 (Sll0822) was found to be dispensable to the growth of both the glucose-tolerant mutant [9] and the wild-type strain [5]. In the glucose-tolerant mutant, AbrB2 appeared to regulate numerous genes involved in nitrogen and carbon assimilation, and to interact with AbrB1 [9,17,18]. In the wild-type strain, we showed that AbrB2 represses its own gene and the *hoxEFUYH* operon [5], and regulates (mostly negatively) a large number of chromosomal genes (tolerance to metal and oxidative stresses) and plasmid genes (unknown functions) [19]. In this *abrB2*-deleted mutant, the increased expression of the anti-oxidant genes *cydAB* (cytochrome bd-quinol oxidase) and *norB* (nitric oxide reductase) are consistent with the

increased production of hydrogen [5]. Indeed, hydrogen production is regarded as an anti-oxidant process that evacuates electrons occurring in excess to prevent them to reduce molecular oxygen and produce toxic reactive oxygen species [1,20].

A few lines of evidence indicated that cyanobacterial AbrB regulators can be post-translationally modified, though the nature and/or the influence of these modifications on their regulatory activity remained unclear. The *Aphanizomenon ovalisporum* AbrB1 protein was proposed to undergo N-acetylation and methylation of specific threonine and lysine amino acid residues [16]. Similarly, the *Synechocystis* AbrB2 protein was proposed to exist in at least two uncharacterized forms [18,21]. Therefore, we pursued the analysis of the *Synechocystis* AbrB2 master regulator that represses hydrogen production [5] and negatively regulates numerous anti-oxidant genes [19]. In agreement with these findings we presently show that AbrB2 down regulates the defence against oxidative stress mediated by the thiol oxidizing agent diamide and that this process involves the single, widely conserved, cysteine of AbrB2. Consistently, this cysteine operates in AbrB2 dimerization, which likely involves the formation of a disulfide bridge between two AbrB2 monomers. Furthermore, this cysteine is the target of glutathionylation, a modification occurring under oxidative stress conditions, which consists in the formation of a mixed-disulfide between the cysteines residues of a protein and a molecule of glutathione (the anti-oxidant tripeptide γ -glutamyl-cysteinyl-glycine). Moreover, the glutathionylation of the AbrB2 cysteine is shown to affect the binding of AbrB2 on the *hox* operon-promoter DNA. To our knowledge, AbrB2 is the first cyanobacterial regulator reported to undergo glutathionylation, emphasizing on the evolutionary conservation of this process, so far mostly described in eukaryotes [22]. These findings will certainly stimulate the analysis of the crosstalk between hydrogen production and the oxidative stress-responsive glutathionylation-and-deglutathionylation process.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, culture conditions and hydrogenase activity assays

Synechocystis PCC6803 (hereafter *Synechocystis*) was grown on mineral medium (MM [23]), at 30 °C or 39 °C, depending on the experiments. For plate assays 10 μ l aliquots of four fold serial dilutions of mid-log phase cultures (2.5×10^7 cells mL⁻¹) were spotted onto solid MM with or without the indicated agents. *Escherichia coli* strains used for gene manipulations (TOP10; Invitrogen), production of recombinant proteins (BL21(DE3);

Novagen), or conjugative transfer to *Synechocystis* (CM404) of the temperature-controlled expression vector pFC1 [4] and its derivatives (Supplementary Table 1) were grown on LB medium at 30 °C (CM404 and TOP10 cells harbouring pFC1 derivatives) or 37 °C (TOP10 and BL21(DE3)). Antibiotic selections were performed as described [5], and gentamycin (Gm) was used at the final concentrations of 25 µg mL⁻¹ for *Synechocystis* and 15 µg mL⁻¹ for *E. coli*. Hydrogenase activities in *Synechocystis* cells were measured as described [5].

2.2. RNA isolation, RT-PCR, quantitative PCR and microarray analysis

RNAs were isolated and studied exactly as we described [5,19].

2.3. Production and purification of the *AbrB2*_{C34S} protein from *E. coli*

The mutant *AbrB2*_{C34S} protein was produced and purified as we described for the wild-type *AbrB2* protein [5]. Briefly, the *abrB2*_{C34S} coding sequence was PCR amplified with specific primers (Supplementary Table 2) and cloned into the pET14b plasmid for in-frame fusion to the 6xHis tag (Supplementary Table 1). The resulting pET14b-*AbrB2*_{C34S} plasmid was introduced into *E. coli* BL21(DE3) cells, which were treated with isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) to induce the production of the 6xHis-*AbrB2*_{C34S} protein, which was purified by affinity chromatography to a purity greater than 95%.

2.4. Western blot analysis of the *AbrB2* and *HoxF* proteins

20–100 µg of *Synechocystis* proteins separated on 12% SDS PAGE (Thermo scientific) were transferred (iBlot system; Invitrogen) to nitrocellulose membrane (Invitrogen), which were blocked for 1 h at room temperature or overnight at 4 °C with 5% non-fat milk in phosphate buffered saline (PBS). Immunodetection was performed using the following rabbit antibodies (Eurogentec): anti-*AbrB2* (antibodies raised against the full *AbrB2* protein; this work; dilution 1:1000) and anti-*HoxF* ([24]; dilution 1:5000). R800 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) were used as secondary antibodies (dilution of 1:1000), and immune complexes were visualized by fluorescence imaging (Odyssey Li-Cor).

2.5. Electromobility shift assays (EMSA)

The *hox* promoter region JD4 [5] was PCR amplified from *Synechocystis* DNA with specific primers (Supplementary Table 2). Then EMSA tests were performed as described [5], except that the 2 min DTT treatment was omitted in the reaction buffer for the experiments performed with *AbrB2* or *AbrB2*_{C34S} proteins that had been glutathionylated as described below (GSSG).

2.6. In vitro glutathionylation of *AbrB2* using oxidized glutathione (GSSG) or biotinylated glutathione (bioGSSG)

The water-soluble biotinylation reagent EZ link sulfo-NHS-Biotin (Perbio Science) was used to couple biotin to the

primary amino group of oxidized glutathione (GSSG), according to [25]. The biotinylation reagent (40 µL, 48 mM) was incubated with GSSG (40 µL, 32 mM) in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) for 1 h at room temperature, generating BioGSSG. Then, free biotin was quenched by adding 28 µL of 0.6 M ammonium carbonate (NH₄HCO₃). *AbrB2* or *AbrB2*_{C34S} proteins were treated or not with alkylating agents (100 mM iodoacetamide (IAM) and 20 mM N-ethylmaleimide (NEM)) for 30 min in the dark, and then incubated for 1 h with 2 mM of BioGSSG in 30 mM Tris–HCl pH 7.9. All treatments were performed at room temperature. Proteins were then loaded on 12% non-reducing SDS-PAGE and analysed by western blot using anti-biotin antibodies as described [25]. For analysis of GSSG-glutathionylated *AbrB2* by MALDI-TOF mass spectrometry, recombinant protein at a concentration of 20 µM was incubated with 5 mM GSSG in 80 mM Tris–HCl pH 7.9 at 25 °C. Aliquots were withdrawn at intervals and analysed by MALDI-TOF mass spectrometry as described [26]. As indicated, the reversibility of the glutathionylation treatment was checked with a 30 min incubation with 50 mM DTT.

3. Results and discussion

3.1. Construction of the *abrB2*-Gm^r and *abrB2*_{C34S}-Gm^r DNA cassettes for in vivo analysis of the role of the single, highly conserved, cysteine of *AbrB2*

In proteobacterial *AbrB* regulators, it is known that the conserved cysteine lying downstream of their « *AbrB*-like » domain is involved in the formation of *AbrB* dimers and tetramers that operate in DNA binding and regulation [27]. By contrast, little is known concerning the regulatory mechanism of cyanobacterial *AbrB* regulators, which were observed only under their monomeric and dimeric forms [8,9,14,15,17,18]. Thus, we pursued the analysis of the *Synechocystis* *AbrB2* regulator (Slr0822 in CyanoBase), which was shown to repress the *hoxEFUYH* hydrogenase operon [5] and to down-regulate regulate a wealth of other genes [19]. We investigated the role of the single cysteine residue of *AbrB2* (hereafter C34 for cysteine at position 34 of the aminoacid sequence) because it is highly conserved in cyanobacterial *AbrB* regulators (data not shown). To replace the C34 residue of *AbrB2* by a serine (S), we constructed the *abrB2*-Gm^r (control) and the *abrB2*_{C34S}-Gm^r DNA cassettes (Supplementary Fig. 1), using specific primers (Supplementary Table 2). After transformation in the *abrB2*-null mutant (*ΔabrB2::Km^r* [5]), selecting for gentamycin resistance, we verified through PCR and DNA-sequencing (data not shown) that the *abrB2*-Gm^r and the *abrB2*_{C34S}-Gm^r cassettes had properly replaced the *ΔabrB2::Km^r* locus (Fig. 1, panel A) in all copies of the polyploid *Synechocystis* chromosome [28]. All strains grew as fit as the wild-type strain in standard photoautotrophic conditions, in agreement with *AbrB2* being dispensable to cell growth [5]. We verified that the *abrB2*-Gm^r and *abrB2*_{C34S}-Gm^r cells produce similar levels of the respective *abrB2* and *abrB2*_{C34S} transcripts on one hand, and *AbrB2* and *AbrB2*_{C34S} proteins on the other hand. The *abrB2* and *abrB2*_{C34S} mRNAs were quantified with quantitative RT-PCR using with the same *abrB2*-specific primers (data not shown). In parallel

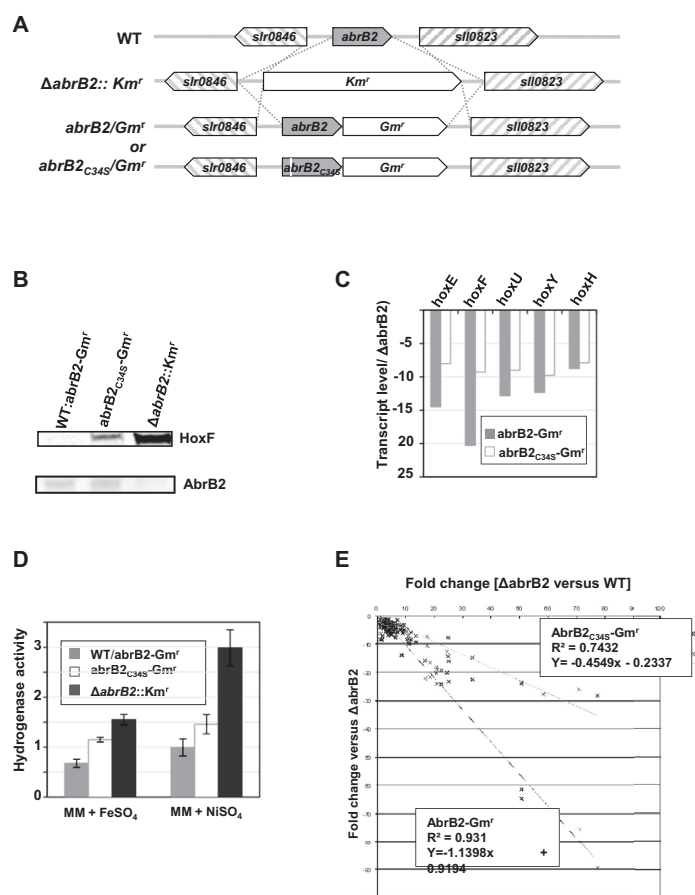


Fig. 1 – A. Schematic representation of the *Synechocystis* *abrB2* chromosome locus in the WT strain (CyanoBase), the *abrB2*-deleted mutant ($\Delta abrB2::Km^r$ [5]), and the two *abrB2-Gm^r*, *abrB2_{C34S}-Gm^r* mutants constructed in this study. The genes are represented by grey (*abrB2*), white (*Km^r* and *Gm^r* markers) or hatched (*slr0846* and *slf0823*) boxes pointing in the direction of their transcription. B. Western blot analysis of the abundance of the AbrB2 and HoxF proteins in the strains *abrB2-Gm^r*, *abrB2_{C34S}-Gm^r* and $\Delta abrB2::Km^r$. Equal amounts of soluble proteins were migrated on a non-reducing SDS-PAGE, and transferred to membrane for western blotting with the indicated anti-AbrB2 or anti-HoxF antibodies. These experiments were performed at least twice. C. Typical histogram plots of the ratios of transcript abundance (measured by quantitative real-time PCR as described [17]) of each five *hoxEFUYH* genes in the *abrB2-Gm^r* and *abrB2_{C34S}-Gm^r* strains over the $\Delta abrB2::Km^r$ mutant. These experiments were performed three times. D. Typical histograms showing hydrogenase activity in $\Delta abrB2::Km^r$, WT/*abrB2-Gm^r* and WT/*abrB2_{C34S}-Gm^r* cells measured as described [5], in the presence of either 500 μ M $FeSO_4$ or 2.5 μ M $NiSO_4$ to increase hydrogenase activities. These experiments were repeated twice. E. Global comparison of the level of expression of AbrB2-regulated genes in *abrB2-Gm^r* versus $\Delta abrB2::Km^r$ cells on one hand (black regression line), and *abrB2_{C34S}-Gm^r* versus $\Delta abrB2::Km^r$ cells on the other hand (grey regression line). These experiments were performed at least twice.

experiments, antibodies specifically recognizing the AbrB2, not the AbrB1 paralog protein (Supplementary Fig. 5), were generated and used for western blot analyses, which showed equal abundance of the AbrB2 and AbrB2_{C34S} proteins (Fig. 1,

panel B). Furthermore, circular dichroism analysis of the AbrB2 and AbrB2_{C34S} proteins confirmed that the C34S mutation did not alter the overall AbrB2 protein structure (Supplementary Fig. 2).

3.2. The single highly-conserved cysteine of AbrB2 is required for the AbrB2-mediated down regulation of the *hoxEFUYH* hydrogenase operon

Quantitative RT-PCR was used to analyze the influence of the C34S mutation of AbrB2 on the repression of the *hoxEFUYH* hydrogenase operon. Total RNAs isolated from the *abrB2*-Gm^r, *abrB2*_{C34S}-Gm^r and Δ *abrB2*::Km^r cells were hybridized with specific RT-PCR primers designed to amplify an internal segment of each five genes *hoxE*, *hoxF*, *hoxU*, *hoxY* and *hoxH* (Supplementary Table 2). The abundance of the five transcripts, which was arbitrarily set to 1.0 in the case of Δ *abrB2*::Km^r cells, was lower in *abrB2*-Gm^r cells as compared to *abrB2*_{C34S}-Gm^r cells (Fig. 1, panel C). Consistently, the levels of the hydrogenase activity encoded by the *hoxEFUYH* operon (Fig. 1, panel D), and of the HoxF protein (Fig. 1, panel B) were decreased in the strains Δ *abrB2*::Km^r, *abrB2*_{C34S}-Gm^r and *abrB2*-Gm^r compared in that order. Collectively, these findings confirm that AbrB2 down-regulates the *hoxEFUYH* operon [5], and they show for the first time that the cysteine of AbrB2 is involved in this process.

3.3. The single highly conserved cysteine of AbrB2 is involved in the AbrB2-mediated regulation of a wealth of genes

Using new tools for global transcriptome analyses, AbrB2 was shown to be a master regulator that regulates a large number of chromosomal genes operating in protection against metal and oxidative stresses, as well as numerous plasmid genes of as yet unknown function [19]. Hence, to test the influence of the C34S mutation of AbrB2 in these regulations, we compared the changes in expression of the AbrB2 down-regulated genes in the strains *abrB2*-Gm^r (presence of the WT AbrB2 protein) versus Δ *abrB2*::Km^r (absence of AbrB2) on one hand, and

*abrB2*_{C34S}-Gm^r (presence of the AbrB2_{C34S} mutant protein) versus Δ *abrB2*::Km^r (absence of AbrB2) on the other hand. The data, analysed with the standard transcriptome criteria (fold change of transcript abundance higher than 2.0, and *p*-value lower than 0.01% [19]), showed that the changes in gene expression were more important when comparing *abrB2*-Gm^r versus Δ *abrB2*::Km^r cells (presence/absence of AbrB2_{WT}) than *abrB2*_{C34S}-Gm^r versus Δ *abrB2*::Km^r cells (presence/absence of AbrB2_{C34S}; Fig. 1, panel E). These results indicate that the single cysteine of AbrB2 operates in numerous AbrB2-mediated down regulations, thereby emphasizing on the interplay between hydrogen production and the global cell metabolism.

3.4. Confirmation that the highly conserved cysteine of AbrB2 is involved in the AbrB2-mediated down regulation of the cell defences against oxidative and metal stresses

We compared the resistance of the three strains *abrB2*-Gm^r, *abrB2*_{C34S}-Gm^r and Δ *abrB2*::Km^r to either an excess of nickel, or the presence of the thiol oxidizing agent diamide (Fig. 2). As expected, the absence of the AbrB2 repressor led to an increased tolerance of *Synechocystis* to both metal and oxidative stresses. Interestingly, the *abrB2*_{C34S}-Gm^r mutant was more resistant to both challenges than the *abrB2*-Gm^r strain. This finding confirmed that the C34 cysteine of AbrB2 is required for the AbrB2-mediated down regulation of the protection against both metal and oxidative stresses.

3.5. The glutathionylation of its highly-conserved cysteine impairs the binding of AbrB2 to the promoter of the *hoxEFUYH* hydrogenase operon

Cyanobacteria are continuously challenged with the toxic reactive oxygen species generated by photosynthesis and

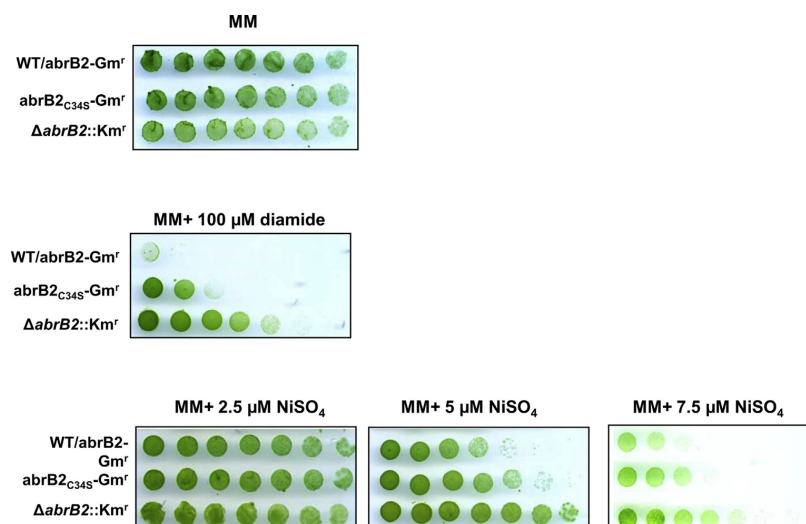


Fig. 2 – Influence of nickel and diamide on the growth of the strains *abrB2*-Gm^r, *abrB2*_{C34S}-Gm^r and Δ *abrB2*::Km^r. Five-fold serial dilutions of mid log phase liquid cultures were spotted onto MM plates with or without the indicated agents, incubated for 4–5 days and scanned [34]. These experiments were done three times.

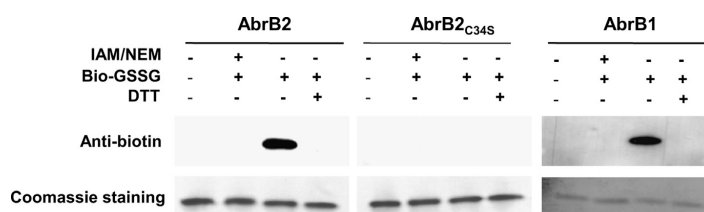


Fig. 3 – Analysis of the glutathionylation of AbrB1 and AbrB2 with biotinylated glutathione BioGSSG. Pre-reduced 6xHis-AbrB1, 6xHis-AbrB2 and 6xHis-AbrB2C34S proteins, treated or not with 2-iodoacetamide (IAM) and N-ethylmaleimide (NEM), were incubated with biotinylated glutathione (BioGSSG). As indicated, the reversibility of AbrB1 and AbrB2 glutathionylation was assessed by treatment with dithiothreitol (DTT). Proteins were resolved by non-reducing SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose for western blotting with anti-biotin antibodies. These experiments were carried out twice.

respiration, which can oxidize the thiol group (SH) of two cysteinyl residues to form disulfide bonds (-S-S-) between proteins, or between a protein and a molecule of the antioxidant tripeptide glutathione (glutathione-protein mixed disulfide, also termed glutathionylation). As glutathionylation is poorly studied in cyanobacteria [29,30], in comparison to eukaryotes [22], we have tested whether the cysteine of AbrB2 might be glutathionylated. Following standard glutathionylation procedures [25], we independently incubated the AbrB2 and AbrB2_{C34S} proteins with biotinylated glutathione (BioGSSG) and analysed the possible presence of glutathione adducts on these proteins by western blot using an anti-biotin antibody (Fig. 3). A clear glutathionylation signal was observed in the case of AbrB2, but not of the cysteine-less AbrB2_{C34S} protein that cannot be glutathionylated. To confirm AbrB2 glutathionylation, we verified that it could be either prevented

by a pre-treatment of AbrB2 with the cysteine-alkylating agents iodoacetamide (IAM) and N-ethylmaleimide (NEM) that impair glutathionylation, or reversed by a post-treatment with the disulfide reducing agent DTT (Fig. 3). AbrB2 glutathionylation was further confirmed by direct visualization with MALDI-TOF mass spectrometry. Indeed, a clear increase in the AbrB2 mass of approximately 306 Da, consistent with the formation of one glutathione adduct per AbrB2 monomer, was observed (Supplemental Fig. 3). The area corresponding to the shifted peak increased with treatment duration and reached more than 80% after 2 h incubation with GSSG. We again verified that AbrB2 glutathionylation could be reversed with DTT. Furthermore, the absence of glutathionylation of the cysteine-less AbrB2_{C34S} protein was also verified (data not shown). These data showing that the unique cysteine of AbrB2 can be glutathionylated are significant because many

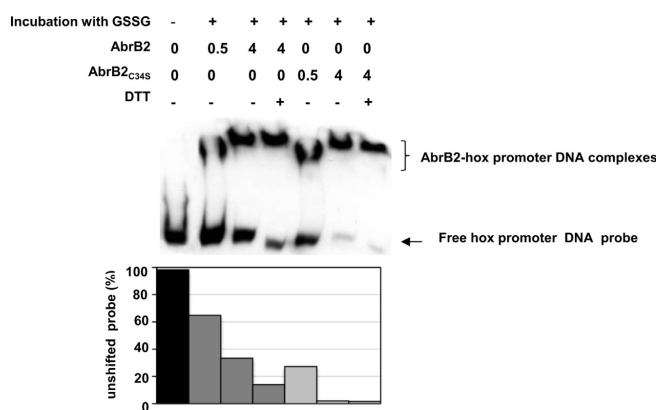


Fig. 4 – Electrophoretic migration-shift assay of the binding of the 6xHis-AbrB2 and 6xHis-AbrB2_{C34S} proteins to the promoter of the hoxEFUYH operon. The DIG-labelled hoxEFUYH promoter DNA [5] was incubated with increasing amounts of purified 6xHis-AbrB2 and 6xHis-AbrB2_{C34S} proteins, which had been pre-treated or not for 6 h with 5 mM GSSG, leading to the glutathionylation of 80% of the 6xHis-AbrB2 protein, and 0% of the cysteine-less His₆-AbrB2_{C34S} protein. Arrows and brace brackets indicate the positions of the free DNA probes and the retarded DNA-protein complexes, respectively. Histogram bars show relative intensities between shifted and unbound DNA signals, quantified with the ImageJ software. These experiments were performed at least two times.

cysteine-containing proteins have been shown to be totally refractory to glutathionylation [31].

Then, the influence of the C34 cysteine of AbrB2, before or after glutathionylation, on the AbrB2 binding to the *hoxEFUYH* operon promoter was studied with electrophoretic migration shift assays [5]. The AbrB2 and AbrB2_{C34S} proteins displayed a similar DNA binding ability, which was reduced by the glutathionylation pretreatment in the case of AbrB2, not of the cysteine-less AbrB2_{C34S} protein that cannot be glutathionylated (Fig. 4). Together, these results indicate that the DNA-binding activity of AbrB2 is influenced by steric hindrance of its amino-acid residues at position 34 (the lower, the better). They also indicate, for the first time, that the activity of a cyanobacterial transcription factor can be controlled by glutathionylation, a process totally overlooked in cyanobacteria so far [29]. In other prokaryotes, only the OxyR regulator is known to be controlled by glutathionylation [32]. We think that our findings will stimulate the in-depth investigation of the relationships between hydrogen production and glutathionylation (oxidative stress). To strengthen the interest in such studies we showed that AbrB1, which regulates the *hoxEFUYH* operon [8,9] and interacts with AbrB2 [17], can also be glutathionylated *in vitro* like AbrB2 (Fig. 3). Thus, it will be interesting in the future to analyze the influence of the glutathionylation of AbrB1 and AbrB2 on their interaction and their regulation of hydrogen production.

3.6. The high-level production of AbrB2 is detrimental to cell growth at 39 °C

To fully investigate the role of the AbrB2 C34 cysteine we also studied the influence of the C34S mutation, using the pFC1 replicating plasmid for temperature-controlled protein production [4]. We previously showed that *Synechocystis* cells propagating the pFC1-abrB2 vector (designated as WT/pFC1-abrB2) tightly control the production of AbrB2, i.e. no production at 30 °C (the standard growth temperature) and strong production after 24 h of induction at 39 °C [5]. During the time course of the present study, we noticed that WT/pFC1-abrB2 cells stopped growing after two days at 39 °C (Supplementary Fig. 4, panel A) and turned yellowish due to loss of photosynthetic pigments (Supplementary Fig. 4, panel B), whereas WT cells retained healthy growth and normal blue-green colour. By contrast, both the WT/pFC1-abrB2 and WT strains grew similarly well at 30 °C because they expressed only the chromosomal WT *abrB2* gene. These results show that the 39 °C-induced accumulation of AbrB2 (Fig. 5) impairs cell fitness by an unknown process, which likely results from the altered expression of the numerous genes (more than 300) regulated by AbrB2 [19].

3.7. The cysteine to serine mutation of AbrB2 abolishes the cell killing effect promoted by the accumulation of AbrB2 driven by a heat-inducible expression vector

To study the influence of the AbrB2 C34 cysteine on the lethality triggered by the accumulation of AbrB2 at 39 °C, the *abrB2*_{C34S} gene (Supplementary Fig. 1) was cloned into pFC1 as we did previously for the WT *abrB2* allele [5]. The resulting pFC1-abrB2_{C34S} plasmid was introduced in *Synechocystis*,

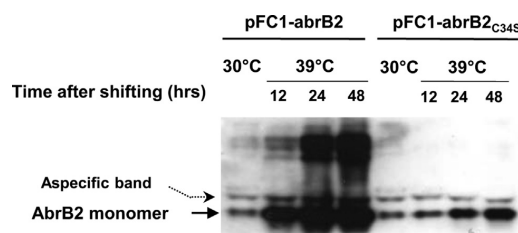


Fig. 5 – Western blot analysis of the abundance of the AbrB2 protein in the strains WT/pFC1-abrB2 and WT/pFC1-abrB2_{C34S} cultivated at 30 °C and then shifted to 39 °C for 12 h, 24 h or 48 h. 20 µg of soluble proteins were migrated on a non-reducing SDS-PAGE, transferred to membrane for western blotting with the indicated anti-AbrB2 antibody. The arrows indicate the AbrB2 monomers and AbrB2 dimers (possibly heterodimers with AbrB1), and an unspecifically detected protein. These experiments were carried out twice.

yielding the WT/pFC1-abrB2_{C34S} strain. At 30 °C, where only the chromosomal WT *abrB2* alleles are expressed, all three strains WT, WT/pFC1-abrB2 and WT/pFC1-abrB2_{C34S} displayed the same healthy growth and normal pigment abundance (Supplementary Fig. 4, panels A and B). At 39 °C where similar high-level expression of the plasmid genes *abrB2* and *abrB2*_{C34S} were induced (Supplementary Fig. 4, panel C), only WT and WT/pFC1-abrB2_{C34S} cells retained normal levels of growth and pigments (Supplementary Fig. 4), whereas WT/pFC1-abrB2 cells died rapidly (Supplementary Fig. 4).

3.8. The single, highly-conserved, cysteine of AbrB2 is critical to in vivo stability of the AbrB2 protein at 39 °C, not at 30 °C

To study why similar high-quantities of the plasmid-driven *abrB2* and *abrB2*_{C34S} transcripts (Supplementary Fig. 4, panel C), either impaired (*abrB2*) or not (*abrB2*_{C34S}) cell growth at 39 °C (Supplementary Fig. 4, panel A), we used western blot to analyze the abundance of the AbrB2 and AbrB2_{C34S} proteins in respectively WT/pFC1-abrB2 and WT/pFC1-abrB2_{C34S} cells. The AbrB2 protein was highly abundant in WT/pFC1-abrB2 cells incubated at 39 °C, where it occurred as both monomers and dimers of similar abundances (Fig. 5). By contrast, the AbrB2_{C34S} protein was not accumulated in WT/pFC1-abrB2_{C34S} cells where no AbrB2_{C34S} dimers could be observed (Fig. 5). The difference in abundance of the AbrB2 and AbrB2_{C34S} proteins cannot be ascribed to cell death and lysis, because it is the WT/pFC1-abrB2 cells, not the WT/pFC1-abrB2_{C34S} cells that were killed by prolonged incubations at 39 °C. The findings that similarly abundant *abrB2* and *abrB2*_{C34S} transcripts translated from the same, pFC1-encoded, efficient ribosome binding site [4,33], yielded different steady-state levels of the AbrB2 and AbrB2_{C34S} proteins, indicate that the lower abundance of AbrB2_{C34S} is due to its lower stability, as compared to AbrB2. Thus, we tested the influence of the temperature on the global protein structure of the AbrB2 and AbrB2_{C34S} proteins

produced and purified from *E. coli*. All circular dichroism spectra monitored at either 30 °C or 40 °C were similar (Supplementary Fig. 2), indicating that the single mutation C34S did not alter the global protein structure of AbrB2.

Collectively, these findings show that the 39 °C-induced accumulation of AbrB2, directed by the pFC1 expression vector, permitted the observation of the dimeric form of AbrB2, and led to cell death. This lethality likely results from the altered expression of the numerous genes (more than 300) regulated by AbrB2 [19]. Our data also indicate that the single highly conserved cysteine of AbrB2 is critical to *in vivo* stability of the AbrB2 protein at 39 °C, not at 30 °C the standard growth temperature.

4. Conclusion

In the prospect of using cyanobacteria for the biological production of hydrogen it is important to thoroughly study the regulation of the hydrogen-production machine in order to better understand its role in the global cell metabolism and identify bottlenecks limiting H₂ production. In this frame, we pursued the analysis of the AbrB2 master regulator, which represses the transcription of hydrogenase-encoding *hoxEFUYH* operon and down-regulates numerous genes involved in stress protection [5,19]. We confirmed these findings in showing that the absence of AbrB2 increases the tolerance to metal and oxidative stresses triggered by nickel and diamide. Furthermore, we show that the single, widely conserved, cysteine of AbrB2 plays a crucial role in all these processes (repression of *hoxEFUYH*; down-regulation of stress-responsive genes and sensitivity to Ni and diamide). Moreover, we show that this cysteine is the target of glutathionylation, which affects the binding of AbrB2 on the promoter of the *hoxEFUYH* operon, as well as the stability of AbrB2 at the non-standard temperature of 39 °C. We view the role of the AbrB2 as follows. In cells growing under standard laboratory conditions, *i.e.* in absence of stress, AbrB2 down-regulates hydrogen production and other stress defences. By contrast, in cells facing oxidative stresses triggered by light excess or metal availabilities, which can be frequent [29], AbrB2 is oxidized and its single cysteine is glutathionylated. Thereafter, AbrB2 is no longer able to repress hydrogen production thereby allowing evacuation of the extra electrons that out-pace their need, among other anti-oxidant processes. After recovery from oxidative stress, AbrB2 activity is restored (likely through deglutathionylation) and starts repressing hydrogen production and other anti-oxidant process, which are no longer required, in order to save photosynthetic electrons.

These novel data emphasizing the evolutionary conservation of the glutathionylation process, so far mostly described in eukaryotes [22,30], will certainly stimulate the in depth analysis of the influence of glutathionylation in the production of hydrogen, a field totally overlooked so far. We are confident in the value of such studies because we showed here that AbrB1, which interacts with AbrB2 and also regulates the *hoxEFUYH* operon [8,9,17], can be glutathionylated *in vitro* like AbrB2. One of the immediate question to ask is what is the influence of the glutathionylation of these AbrB regulators on

their interaction and its consequence on hydrogen production.

Acknowledgements

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche Grants ANR-09-BIOE-002-01 (EngineeringH2cyano) and ANR Blanc08-0153 (GLUTAPHOTO), and CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) Programme Interdisciplinaire Energie PIE2 (Reprogramhydrogen). J.D., S.S., P.S., C.L. and S.S. were recipients of fellowships from the CEA (J.D.) and ANR (S.S.; C.L.; M.O-R; V.C. and P.S.). We also thank Cécile Fairhead for access to the «ArraySud transcriptome plateau technique».

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.124>.

REFERENCES

- [1] Carrieri D, Wawrousek K, Eckert C, Yu J, Maness PC. The role of the bidirectional hydrogenase in cyanobacteria. *Bioresource Technology* 2011;102:8368–77.
- [2] Grigorieva G, Shestakov S. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp 6803. *FEMS Microbiology Letters* 1982;13:367–70.
- [3] Marraccini P, Bulteau S, Cassier-Chauvat C, Mermet-Bouvier P, Chauvat F. A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of the genera *Synechococcus* and *Synechocystis*. *Plant Molecular Biology* 1993;23:905–9.
- [4] Mermet-Bouvier P, Chauvat F. A conditional expression vector for the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strains PCC6803 and PCC6714 or *Synechococcus* sp. strains PCC7942 and PCC6301. *Current Microbiology* 1994;28:145–8.
- [5] Dutheil J, Saenkham P, Sakr S, Leplat C, Ortega-Ramos M, Bottin H, et al. The AbrB2 autorepressor, expressed from an atypical promoter, represses the hydrogenase operon to regulate hydrogen production in *Synechocystis* strain PCC6803. *Journal of Bacteriology* 2012;194:5423–33.
- [6] Gutekunst K, Phunpruch S, Schwarz C, Schuchardt S, Schulz-Friedrich R, Appel J. LexA regulates the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a transcription activator. *Molecular Microbiology* 2005;58:810–23.
- [7] Oliveira P, Lindblad P. LexA, a transcription regulator binding in the promoter region of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiology Letters* 2005;251:59–66.
- [8] Oliveira P, Lindblad P. An AbrB-Like protein regulates the expression of the bidirectional hydrogenase in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology* 2008;190:1011–9.
- [9] Ishii A, Hihara Y. An AbrB-like transcriptional regulator, Sll0822, is essential for the activation of nitrogen-regulated genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiology* 2008;148:660–70.
- [10] Shih PM, Wu D, Latifi A, Axen SD, Fewer DP, Talla E, et al. Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using

- diversity-driven genome sequencing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2013;110:1053–8.
- [11] Larsson J, Nylander JAA, Bergman B. Genome fluctuations in cyanobacteria reflect evolutionary, developmental and adaptive traits. BMC Evolutionary Biology 2011;11.
 - [12] Chumsakul O, Takahashi H, Oshima T, Hishimoto T, Kanaya S, Ogasawara N, et al. Genome-wide binding profiles of the *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB and its homolog Abh reveals their interactive role in transcriptional regulation. Nucleic Acids Research 2011;39:414–28.
 - [13] Onizuka T, Akiyama H, Endo S, Kanai S, Hirano M, Tanaka S, et al. CO(2) response element and corresponding trans-acting factor of the promoter for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes in *Synechococcus* sp. PCC7002 found by an improved electrophoretic mobility shift assay. Plant & Cell Physiology 2002;43:660–7.
 - [14] Agervald A, Baebprasert W, Zhang X, Incharoensakdi A, Lindblad P, Stensjo K. The CyAbrB transcription factor CalA regulates the iron superoxide dismutase in *Nostoc* sp. strain PCC 7120. Environmental Microbiology 2010;12:2826–37.
 - [15] Agervald A, Zhang XH, Stensjo K, Devine E, Lindblad P. CalA, a cyanobacterial AbrB protein, interacts with the upstream region of *hypC* and Acts as a repressor of its transcription in the cyanobacterium *Nostoc* sp strain PCC 7120. Applied and Environmental Microbiology 2010;76:880–90.
 - [16] Shalev-Malul G, Lieman-Hurwitz J, Viner-Mozzini Y, Sukenik A, Gaathon A, Lebendiker M, et al. An AbrB-like protein might be involved in the regulation of cylindrospermopsin production by *Aphanizomenon ovalisporum*. Environmental Microbiology 2008;10:988–99.
 - [17] Yamauchi Y, Kaniya Y, Kaneko Y, Hihara Y. Physiological roles of the cyAbrB transcriptional regulator pair Slr0822 and Slr0359 in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. Journal of Bacteriology 2011;193:3702–9.
 - [18] Lieman-Hurwitz J, Haimovich M, Shalev-Malul G, Ishii A, Hihara Y, Gaathon A, et al. A cyanobacterial AbrB-like protein affects the apparent photosynthetic affinity for CO₂ by modulating low-CO₂-induced gene expression. Environmental Microbiology 2009;11:927–36.
 - [19] Leplat C, Champeimont R, Saenkhom P, Cassier-Chauvat C, Jean-Christophe A, Chauvat F. Genome-wide transcriptome analysis of hydrogen production in the cyanobacterium *Synechocystis*: towards the identification of new players. International Journal of Hydrogen Energy 2013;38:1866–72.
 - [20] Cournac L, Guedeney G, Peltier G, Vignais PM. Sustained photoevolution of molecular hydrogen in a mutant of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 deficient in the type I NADPH-dehydrogenase complex. Journal of Bacteriology 2004;186:1737–46.
 - [21] Sazuka T, Yamaguchi M, Ohara O. Cyano2Dbase updated: Linkage of 234 protein spots to corresponding genes through N-terminal microsequencing. Electrophoresis 1999;20:2160–71.
 - [22] Zaffagnini M, Bedhomme M, Marchand CH, Morisse S, Trost P, Lemaire SD. Redox regulation in photosynthetic organisms: focus on glutathionylation. Antioxidants & Redox Signaling 2012;16:567–86.
 - [23] Domain F, Houot L, Chauvat F, Cassier-Chauvat C. Function and regulation of the cyanobacterial genes *lexA*, *recA* and *ruvB*: LexA is critical to the survival of cells facing inorganic carbon starvation. Molecular Microbiology 2004;53:65–80.
 - [24] Aubert-Jousset E, Cano M, Guedeney G, Richaud P, Cournac L. Role of HoxE subunit in *Synechocystis* PCC6803 hydrogenase. The FEBS Journal 2011;278:4035–43.
 - [25] Bedhomme M, Zaffagnini M, Marchand CH, Gao XH, Moslonka-Lefebvre M, Michelet L, et al. Regulation by glutathionylation of isocitrate lyase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Journal of Biological Chemistry 2009;284:36282–91.
 - [26] Augusto LA, Decottignies P, Synguelakis M, Nicaise M, Le Marechal P, Chaby R. Histones: a novel class of lipopolysaccharide-binding molecules. Biochemistry 2003;42:3929–38.
 - [27] Olson AL, Liu F, Tucker AT, Goshe MB, Cavanagh J. Chemical crosslinking and LC/MS analysis to determine protein domain orientation: Application to AbrB. Biochemical and Biophysical Research Communications 2013;431:253–7.
 - [28] Labarre J, Chauvat F, Thuriaux P. Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. Journal of Bacteriology 1989;171:3449–57.
 - [29] Narainsamy K, Marteyn B, Sakr S, Cassier-Chauvat C, Chauvat F. Genomics of the pleiotropic glutathione system in cyanobacteria. In: Cassier-Chauvat C, Chauvat F, editors. Genomics of cyanobacteria. Elsevier: Academic Press; 2013. p. 157–88.
 - [30] Marteyn B, Sakr S, Farci S, Bedhomme M, Chardonnet S, Decottignies P, et al. The *Synechocystis* PCC6803 MerA-like enzyme operates in the reduction of both mercury and uranium, under the control of the glutaredoxin 1 enzyme. Journal of Bacteriology 2013.
 - [31] Michelet L, Zaffagnini M, Marchand C, Collin V, Decottignies P, Tsan P, et al. Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2005;102:16478–83.
 - [32] Masip L, Veeravalli K, Georgiou G. The many faces of glutathione in bacteria. Antioxidants & Redox Signaling 2006;8:753–62.
 - [33] Poncelet M, Cassier-Chauvat C, Leschelle X, Bottin H, Chauvat F. Targeted deletion and mutational analysis of the essential (2Fe-2S) plant-like ferredoxin in *Synechocystis* PCC6803 by plasmid shuffling. Molecular Microbiology 1998;28:813–21.
 - [34] Houot L, Floutier M, Marteyn B, Michaut M, Picciocchi A, Legrain P, et al. Cadmium triggers an integrated reprogramming of the metabolism of *Synechocystis* PCC6803, under the control of the Slr1738 regulator. BMC Genomics 2007;8:350.

Résultats complémentaires des articles II et III

CONSTRUCTION D'UN MUTANT DE DELETION DU REPRESSEUR ABRB2 QUI SUREXPRIME L'OPERON *HOXEFUYH*

OBJECTIF

Comme évoqué dans les chapitres précédents, pour mieux comprendre la machinerie de photo-production d'hydrogène chez *Synechocystis*, il faut étudier non seulement l'assemblage et son activité hydrogénase mais également la régulation transcriptionnelle du métabolisme de production d'H₂.

Dans les résultats présentés précédemment, il a été montré que l'opéron *hox* qui code pour l'hydrogénase est régulé négativement par le régulateur AbrB2 qui se fixe sur son promoteur (Article II). D'autre part, nous avons également montré qu'AbrB2 est impliquée dans la répression directe ou indirecte de gènes impliqués dans la tolérance au stress oxydant et métallique (Article III). D'autre part au laboratoire des études de transcriptomique sur le mutant AbrB2 ont révélé que plus de 300 gènes étaient régulés négativement par AbrB2, Parmi ces gènes, plusieurs sont de fonction inconnue et pourraient être impliqués directement ou indirectement dans la production d'hydrogène (Leplat *et al.*, 2013). Enlever un effecteur négatif comme AbrB2 pourrait s'avérer intéressant pour une meilleure production d'hydrogène.

Dans ce travail, nous avons voulu combiner la surproduction de l'hydrogénase et la délétion de ce régulateur pour augmenter la production d'hydrogène.

RESULTATS

Les résultats présentés dans cette partie sont des résultats préliminaires qui doivent être confirmés.

La délétion de la totalité du gène *abrB2* par une cassette de résistance à la Spectinomycine/Streptomycine a permis d'obtenir un mutant (Δ abrB2) dépourvu de toutes les copies du gène *abrB2* dans la souche sauvage de *Synechocystis* (WT Δ abrB2 et dans le mutant CE1 (CE1 Δ abrB2) (Figure 48 ; Figure 49).

Comme l'étude précédente, la délétion d'*abrB2* n'affecte pas la croissance en conditions standard de croissance et ne montre pas d'altération de pigmentation pour le WT Δ abrB2 et le CE1 Δ abrB2 (Figure 50). Par ailleurs, dans le mutant Δ abrB2 on observe une augmentation de l'activité hydrogénase qui est due à l'absence de régulation négative sur l'hydrogénase et qui est en accord avec les résultats précédents (Article I et II). Dans le mutant CE1 on a également une augmentation de l'activité hydrogénase, ce qui est cohérent avec l'augmentation des transcrits et des protéines Hox, des résultats précédents (Article I). Cependant lorsque l'on combine la délétion du gène *abrB2* et la surexpression des gènes *hox*, le gain en activité hydrogénase comparé au WT est faible et l'activité hydrogénase de CE1 Δ abrB2 est légèrement plus faible que les mutants

Δ abrB2 et CE1 (Figure 50). Ces résultats montrent que lorsque l'hydrogénase Hox est surproduit, la délétion d'AbrB2 n'améliore pas davantage l'activité et inversement.

On remarque également, par des tests de tolérance au nickel et au diamide que lorsque l'on délète *abrB2* dans le WT on augmente la tolérance au nickel et au diamide ce qui est en accord avec les résultats précédents, mais lorsque l'on combine cette délétion avec la surproduction de l'hydrogénase, les cellules résistent encore mieux au stress surtout celui causé par le diamide (Figure 51). Ce résultat suggère qu'en condition de stress la surproduction d'hydrogénase est favorable à la résistance au stress causé par le diamide et d'autant plus lorsque le régulateur négatif AbrB2 est absent.

CONCLUSION

Ces résultats préliminaires montrent que la surexpression des gènes *hox* et la délétion du gène codant le régulateur AbrB2 n'est pas létale pour la cellule. De plus, cette combinaison n'améliore pas l'activité hydrogénase et donc la quantité d'hydrogénase active dans des conditions standard de croissance. Mais dans des conditions de stress, la surexpression des gènes *hox* et la délétion du régulateur AbrB2 semble intervenir en améliorant la tolérance au stress oxydant et métallique.

On peut imaginer que dans les conditions standard en l'absence de stress, dans la souche WT, AbrB2 réprime les gènes *hox* et d'autres facteurs impliqués dans la production d'hydrogène. Dans ces conditions, les facteurs réprimés par AbrB2, n'interviennent pas dans la formation d'hydrogénase active mais sur d'autres aspects du métabolisme de production d'hydrogène, comme l'alimentation de l'hydrogénase. Il serait donc intéressant de mesurer la photoproduction dans ces mutants.

Par des études de transcriptomique (Leplat *et al.*, 2013) on sait qu'AbrB2 régule négativement des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant, et lorsque AbrB2 est absent, les cellules sont plus résistantes à ce stress (Article I). On peut supposer que dans les mutants Δ abrB2 exposés à des conditions oxydantes, les gènes impliqués dans le métabolisme de l'hydrogène (qui sont normalement régulés négativement par AbrB2) vont améliorer le processus de photoproduction pour évacuer le stress oxydant par l'hydrogénase et par conséquent, plus il y a d'hydrogénase, plus la tolérance augmente.

Ces résultats doivent être confirmés, et posent des hypothèses sur une régulation de l'activité hydrogénase par d'autres acteurs inconnus en fonction des conditions de croissance et du stress que subissent les cellules. Par ailleurs, sachant que l'assemblage de l'hydrogénase est un facteur limitant dans l'augmentation de la quantité d'hydrogénase active, il serait également intéressant de construire un mutant de surproduction de l'hydrogénase et de son assemblage avec la délétion du régulateur AbrB2.

Construction of the $\Delta abrB2 :: Sp/Sm^r$ deletion cassette

Organization of the *Synechocystis* genomic region containing the *abrB2* gene

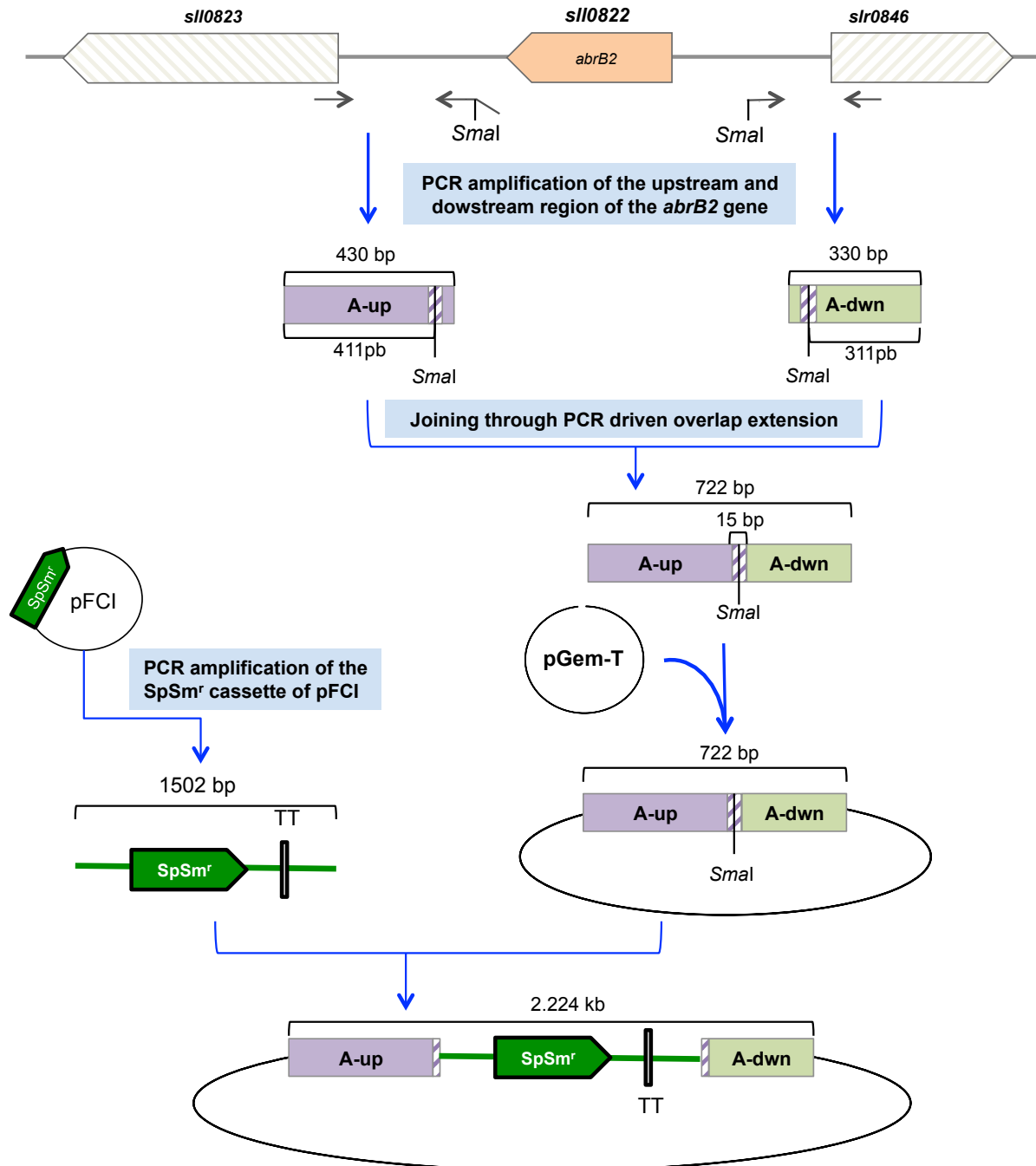
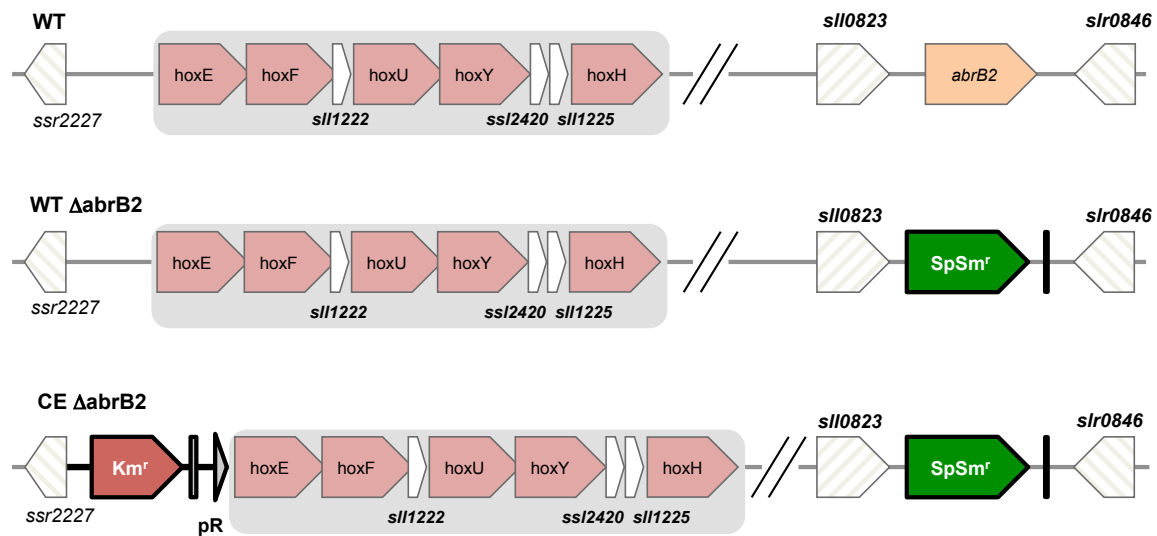


Figure 48 : Construction of the DNA cassette for the deletion of the *abrB2* gene

A. Genomic region of the WT, WT Δ abrB2 and CE1 Δ abrB2



B. PCR verification of the WT Δ abrB2 and CE1 Δ abrB2

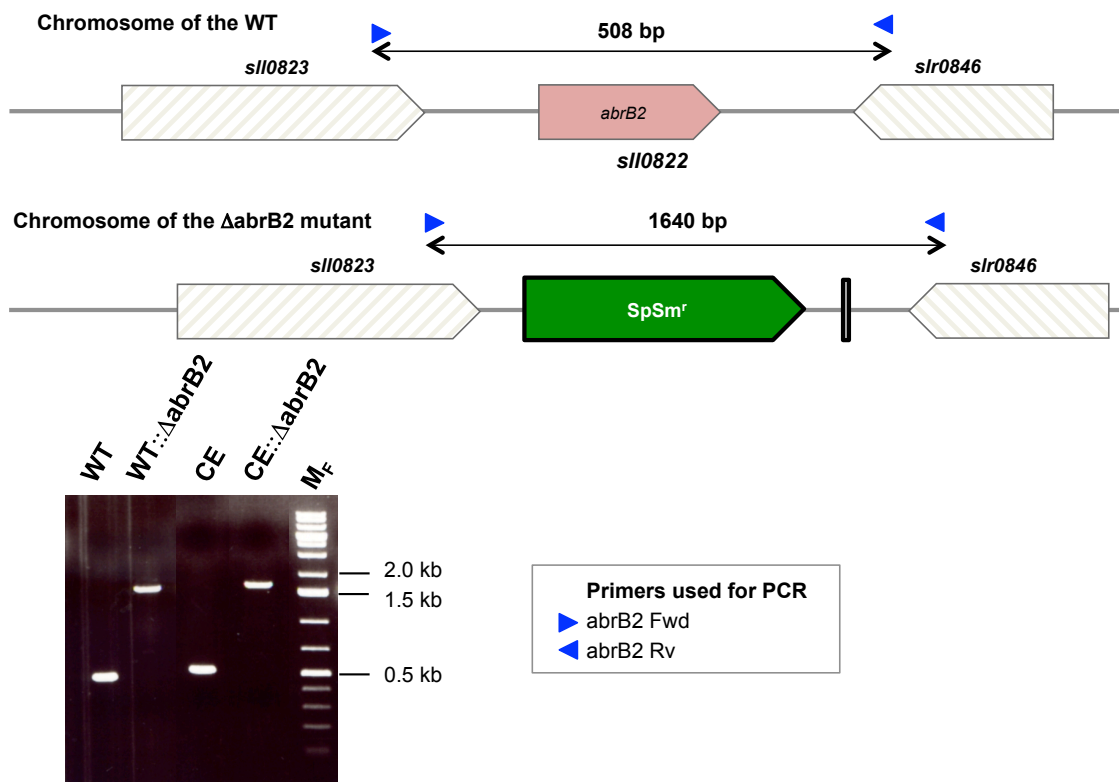


Figure 49: PCR verification of the Δ abrB2::Sp/Sm^r mutants showing that the replacement of the *abrB2* gene by the Sp/Sm^r marker occurred in all copies of the polyploid chromosome of *Synechocystis*. (A) Schematic representation of the genome in the wild-type strain (WT), the Δ abrB2, the CE1 and the CE1 Δ abrB2 (B) The small blue triangles represent the oligonucleotides primers that generated the PCR DNA segments (double arrows) typical of the WT strain or the Δ abrB2 mutant. UV-light image of the agarose gel showing the 508 kb and 1640 kb PCR products typical of the chromosome organization in the WT strain and the Δ abrB2 mutant growing in standard conditions. Marker (M_F) = 1Kb plus DNA Ladder (Fermentas).

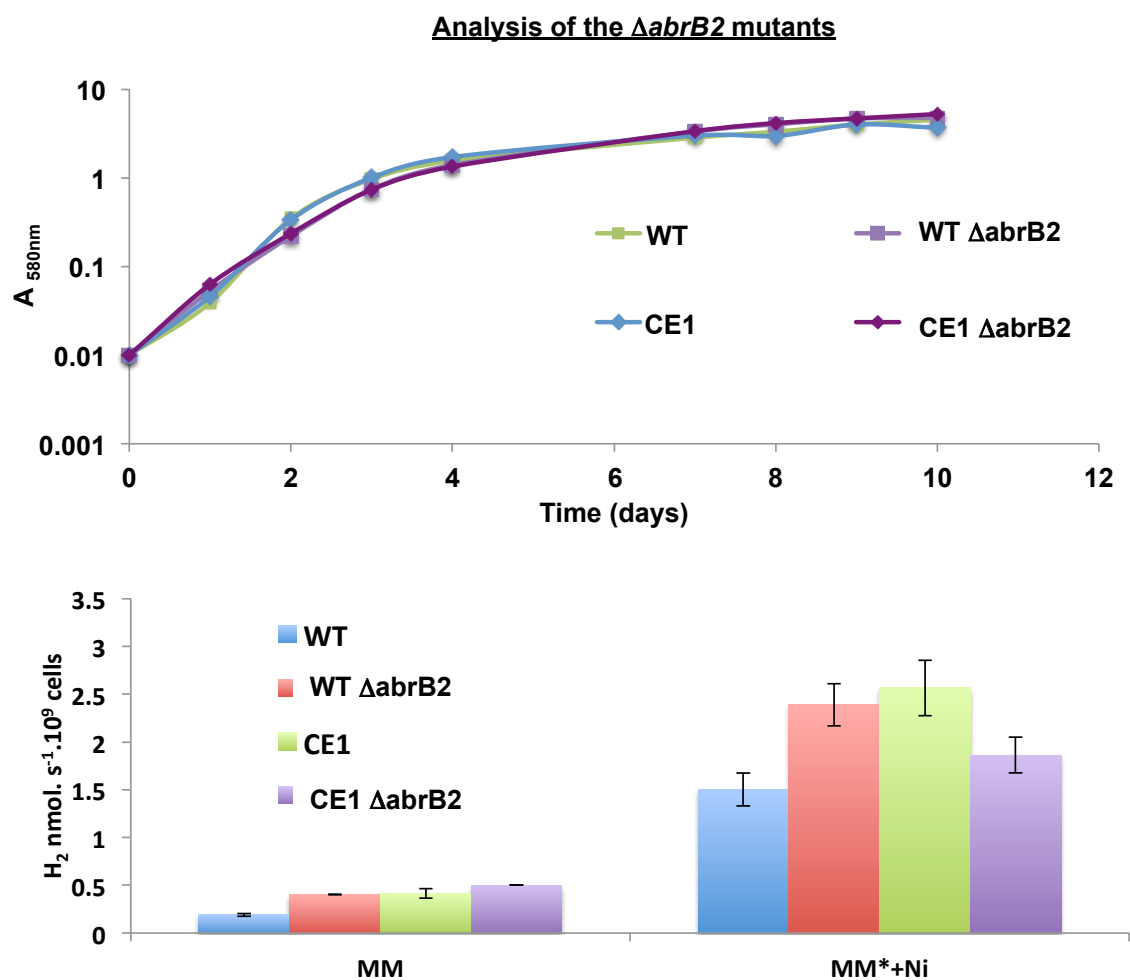


Figure 50 : Analysis of the *Synechocystis* $\Delta abrB2::Sp/Sm^r$ mutant $\Delta abrB2$). (A) Typical growth of the WT (green), CE (blue), $\Delta abrB2$ (purple light) and CE1 $\Delta abrB2$ cells (purple) in standard conditions at 30°C. (B) Histograms representation of the hydrogenase activities of WT, CE1, $\Delta abrB2$ and CE1 $\Delta abrB2$ cells grown at 30°C.

Analysis of the $\Delta abrB2$ mutants

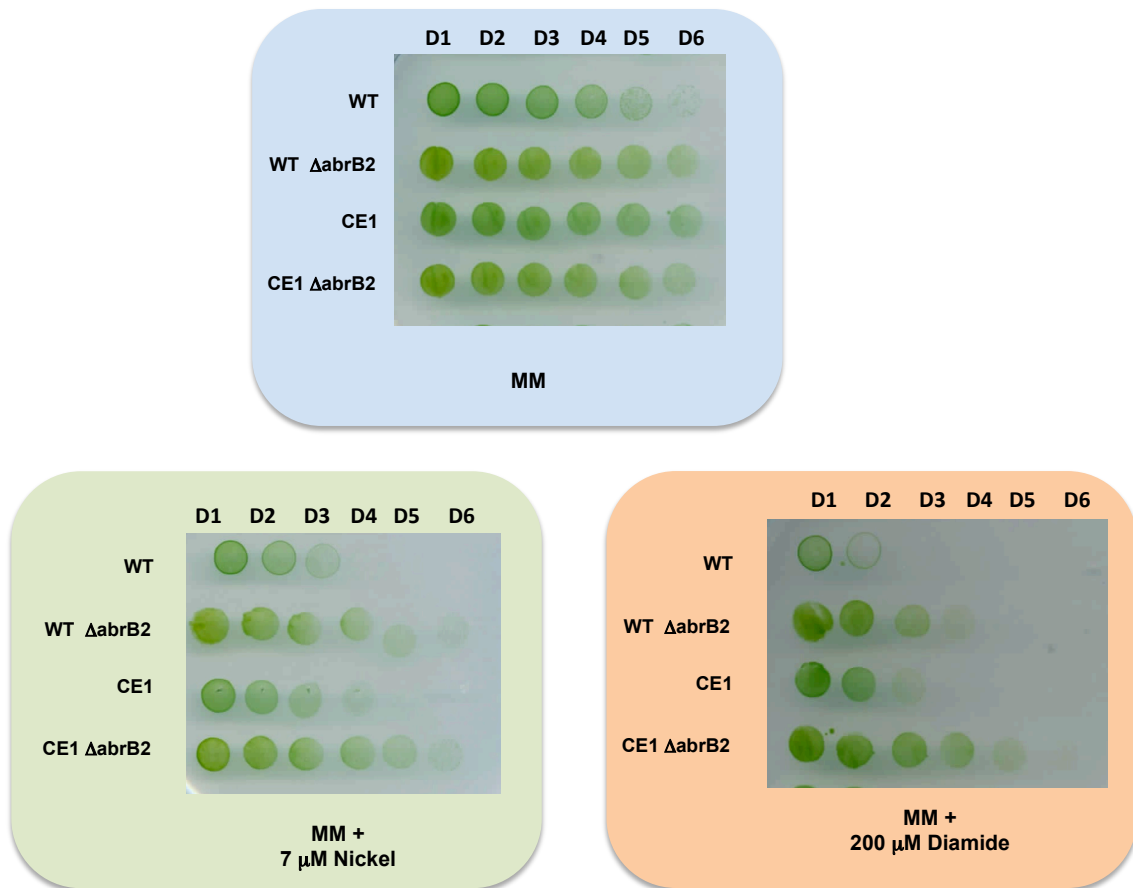


Figure 51 : Influence of nickel and diamide on the growth of the strains WT, CE1, $\Delta abrB2$ and CE1 $\Delta abrB2$. Five-fold serial dilutions of mid-log phase liquid cultures were spotted onto MM plates with or without the indicate agents, incubated for 4-5 days and scanned.

Conclusion et Perspectives

Conclusion

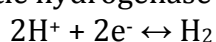
La photosynthèse est un processus essentiel pour la vie sur Terre puisqu'il permet grâce à l'énergie solaire (quasi-inépuisable) de créer de nombreuses molécules indispensables au fonctionnement des cellules. En redirigeant ce mécanisme on peut également produire des bioproduits (hydrogène, lipides, bioplastiques, molécules thérapeutiques, etc.). L'hydrogène (H₂) est une molécule simple, très énergétique qui promet de nombreuses solutions en tant que vecteur d'énergie ou comme carburant propre pour le futur. De nos jours, l'hydrogène est produit quasi-exclusivement par la combustion d'hydrocarbures fossiles qui sont des procédés hautement énergivores et qui dégagent du CO₂. Le développement d'une filière de production d'hydrogène propre et durable permettrait de concilier la production industrielle et la protection de l'environnement.

Actuellement, les micro-algues vertes et les cyanobactéries sont les meilleurs candidats pour produire de manière propre et soutenable de l'hydrogène, en utilisant la photosynthèse, l'énergie solaire et l'eau qui sont quasi-inépuisables pour produire de l'hydrogène grâce au système photosynthétique, sans dégagement de polluant.

Dans la nature, la photoproduction d'hydrogène est un phénomène transitoire qui génère peu d'hydrogène. De plus, le métabolisme de production d'hydrogène et particulièrement le rôle des hydrogénases chez les micro-algues et les cyanobactéries reste mal connu. Comprendre le rôle du métabolisme de l'hydrogène dans ces organismes est une étape clé pour optimiser les conditions environnementales et les manipulations génétiques afin d'améliorer la productivité. Les algues vertes sont souvent considérées comme plus productives car leur taux de conversion d'énergie solaire en hydrogène est plus élevé (1,33%) que chez les cyanobactéries (0,14%) (Carrieri *et al.*, 2011). Cependant les cyanobactéries sont plus faciles à manipuler génétiquement et leur hydrogénase est inactivée par l'oxygène de manière réversible, contrairement aux hydrogénases algales qui sont irréversiblement inactivées.

La cyanobactérie modèle *Synechocystis* est un candidat idéal pour étudier le métabolisme de production d'hydrogène. C'est une cyanobactérie unicellulaire, dont le génome est entièrement séquencé, facilement manipulable, qui possède une hydrogénase bidirectionnelle Hox.

L'hydrogénase Hox s'exprime à partir d'un opéron octacistronique comportant 5 gènes *hoxEFUYH* entrecoupés par trois gènes de fonction inconnue. Les gènes *hox* sont exprimés à partir d'un faible promoteur qui est régulé par trois régulateurs LexA, AbrB1 et AbrB2. LexA et AbrB1 régulent positivement l'opéron *hox* (Gutekunst *et al.*, 2005 ; Oliveira *et al.*, 2008) tandis qu'AbrB2 le régule négativement (Dutheil *et al.*, 2012, Article II). Les gènes *hox* codent pour cinq sous-unités qui vont former une partie diaphorase (HoxEFU) et une partie hydrogénase (HoxYH) qui comportent plusieurs centres [FeS] et un centre actif [NiFe]. La sous-unité HoxH contient le site catalytique [NiFe] réversiblement inactivée par l'oxygène. L'assemblage du site actif [NiFe] fait intervenir un deuxième complexe codé par cinq gènes *hypABCDEFG* éparpillés dans le génome de *Synechocystis*. Pour finir, une protéase HoxW clive la partie C-terminale de HoxH pour compléter sa maturation. Une fois assemblée, la partie diaphorase va transférer les électrons issus du NAD(P)H à la partie hydrogénase qui catalysent la réaction :



Comme discuté précédemment, la production d'hydrogène dans les conditions photo-autotrophiques standard est faible et transitoire. Les travaux antérieurs pour améliorer la faible photoproduction naturelle d'hydrogène, principalement effectués chez la cyanobactérie modèle *Synechocystis*, ont généré des protocoles de carence (lumière, azote et/ou soufre) qui réduisent l'activité photosynthétique, et donc la production d'oxygène qui inhibe l'hydrogénase. Ces protocoles, réduisant la croissance cellulaire, ne permettent pas la production de biomasses importantes, nécessaires à la photoproduction massive d'hydrogène (Tamagnini et al. 2007)(Kiss et al. 2009).

L'équipe de Germer et ses collaborateurs ont également tenté d'augmenter la production d'hydrogène chez *Synechocystis* par des modifications génétiques. Pour cela, ils ont surexprimé l'opéron *hox* et les gènes *hyp* (issus de l'opéron de *Nostoc* PCC7120) à partir d'un promoteur inductible par la lumière *psbAII* (Germer et al., 2009). Afin de purifier l'enzyme, un tag a été ajouté à la suite de HoxF avec une cassette de résistance à la kanamycine. Le gain en activité était faible (3,2 X), ce résultat peut être dû à :

- la surexpression des gènes *hox* et *hyp* à partir du promoteur *psbAII* nécessite une intensité lumineuse importante ce qui augmente l'activité photosynthétique qui produit de l'oxygène, inhibant l'hydrogénase;
- Afin de purifier l'enzyme, un tag a été ajouté à la suite de HoxF, ce qui peut modifier la structure de l'hydrogénase ou l'activité de HoxF qui fixe le NAD(P)⁺ ;
- L'insertion de la cassette de kanamycine dans l'opéron *hox* peut entraîner des modifications de transcription des gènes en aval ;
- L'opéron *hyp* de *Nostoc* PCC7120 possède un gène codant pour une protéine qui n'est pas présente chez *Synechocystis*, qui peut interférer avec la production d'hydrogène ou perturber le métabolisme de *Synechocystis*.

Au cours de ma thèse en collaboration avec les post-doctorantes Panatda Saenkham et Thichakorn Jittawuttipoka et la technicienne supérieure Aurélia Czamecka-Kwasiborski, nous avons développé plusieurs techniques pour analyser la machinerie de production d'hydrogène chez *Synechocystis* afin de mieux la comprendre et d'améliorer sa production.

1. Construction de mutant de surproduction de l'hydrogénase active (Hox, Hyp)

Pour améliorer la production d'hydrogène chez *Synechocystis*, nous avons commencé par surexprimer de manière thermorégulée l'opéron *hoxEFUYH* dans le mutant TR1. Le mutant montre un gain important de transcrit *hoxEFUYH* (jusqu'à 26 fois) et de protéines HoxF et HoxH par rapport au WT, cependant le gain en activité hydrogénase reste faible. Ce qui prouve qu'il existe des étapes limitantes, comme l'assemblage du site actif [NiFe]. Pour cela, il a été nécessaire de construire un mutant de surexpression simultanée des gènes *hox*, et des gènes *hypABCDEF* qui codent pour l'assemblage du site actif de l'hydrogénase. Construire ce mutant a été un travail de longue haleine car il a nécessité de nombreuses étapes de clonages (jusqu'à 9). En effet, les gènes *hyp* sont éparpillés dans le génome de *Synechocystis*. On a donc construit un mutant TR2 qui surexprime l'opéron *hox* dans le chromosome et les gènes *hyp* à partir d'un plasmide réplcatif dans lequel on a cloné les six gènes *hyp* à la suite, sous le contrôle d'un système de surexpression thermorégulée. Dans ce mutant on observe une

surexpression importante des gènes *hox* et des gènes *hyp*, ainsi que l'augmentation de l'abondance des protéines HoxF et HoxH. Par ailleurs, on remarque une abondance plus importante de la protéine HoxH qui possède le site actif [NiFe] dans le mutant TR2 que le mutant TR1, la surexpression des gènes *hyp* impliqués dans l'assemblage permettent sûrement une stabilisation de cette protéine. De plus ce mutant montre une activité hydrogénase plus importante que le mutant TR1, mais qui reste faible comparée à l'augmentation de transcrit (*hox* et *hyp*) et protéines (HoxF et HoxH).

L'hydrogénase possède un site actif [NiFe] essentiel pour son activité, or dans le milieu de croissance (MM) il n'y en a que des traces. Des travaux antérieurs suggèrent que l'augmentation de nickel améliore l'activité hydrogénase chez *Arthrospira maxima* (Carrieri *et al.*, 2008). En ajoutant du nickel et du fer dans le milieu de croissance de *Synechocystis*, une augmentation de l'activité hydrogénase dans les souches WT, TR1 et TR2 jusqu'à 6 fois plus importante a été observée. Cette optimisation du milieu nous permet d'avoir un gain d'activité 13 fois plus important dans le mutant TR2 en MM* (MM avec 2,5 µM de NiSO₄ et 34 µM de Fe(N₄)C₆H₅O₇) par rapport au WT en MM. Grâce aux résultats obtenus nous sommes parvenus à lever de nombreuses étapes limitantes qui nous ont permis d'augmenter la quantité d'hydrogénase active. Le mutant TR2 est le premier mutant de surexpression contrôlée des gènes *hox* et des gènes *hyp* endogènes chez *Synechocystis*. L'analyse de ce mutant par des puces ADN nous permettrait de caractériser les réponses transcriptomiques (rapides ou longues) d'une surexpression de la machinerie de photo-production d'hydrogène.

Dans le but d'augmenter d'autant plus l'activité hydrogénase chez *Synechocystis* et sachant que la surexpression des gènes *hox* et *hyp* n'était pas létale, on a construit des mutants avec un système de surexpression plus fort. Un mutant CE1 de surexpression constitutive des gènes *hox* et un mutant CE2 de surexpression constitutive simultanée des gènes *hox* et *hyp*. Ces mutants qui poussent aussi bien que le WT, montrent une surexpression plus importante des gènes *hox* et *hyp* ainsi qu'une augmentation des protéines Hox, ce qui confirme que la surexpression n'est pas létale. En outre, en combinant la surexpression constitutive des gènes *hox* et *hyp* ainsi que l'optimisation du milieu, on augmente l'activité hydrogénase d'un facteur 17. Ce mutant est le premier mutant de surexpression constitutive des gènes *hox* et *hyp* endogènes chez *Synechocystis*. Des analyses de ce mutant par des données transcriptomique et protéomique nous permettraient de caractériser des voies liées au métabolisme de l'hydrogène.

Dans le même objectif d'améliorer la maturation de l'hydrogénase, nous avons construit un mutant CE4 de surexpression des gènes *hox* et du gène *hoxW*. HoxW code pour une protéase qui clive la sous-unité HoxH contenant le site actif [NiFe], une étape importante pour finaliser la maturation de cette sous-unité. Ce mutant CE4 surexprime à partir d'un promoteur fort (p_R) l'opéron *hox* suivi du gène *hoxW*, de plus on constate une augmentation plus importante de la protéine HoxH dans le mutant CE4 que CE1 (qui ne surexprime que *hoxEFUYH*). Ceci suggère que la protéine HoxH est également stabilisée par ce processus de maturation. Malgré l'abondance plus importante de la protéine HoxH, l'activité hydrogénase est seulement augmentée d'un facteur 15 en MM* (MM avec Ni et Fe) comparée au WT en MM, ce qui est faiblement augmenter par rapport au mutant CE1. Il semblerait que la surexpression du gène *hoxW* ne soit pas suffisante pour améliorer l'activité de l'hydrogénase.

Selon des publications récentes, cette étape de clivage nécessite au préalable l'assemblage du site actif [NiFe] (Eckert *et al.*, 2012). Il est donc indispensable pour s'assurer d'augmenter le taux d'hydrogénase active, de surexprimer à la fois les gènes qui codent pour l'hydrogénase (*hoxEFUYH*), les gènes qui codent pour l'assemblage du site actif (*hypABCDEF*) et le clivage de HoxH (*hoxW*). Le mutant CE5 surexprime l'opéron *hox* et le gène *hoxW* dans le chromosome et les gènes *hypABCDEF* à partir d'un plasmide réplcatif (pCE-hypA-F). L'activité hydrogénase dans ce mutant en MM* (MM avec Ni et Fe) est 3 fois plus importante que le WT en MM* et par conséquent 20 fois plus importante que le WT en MM, ce qui confirme la nécessité non seulement de l'hydrogénase mais également des protéines d'assemblage et de maturation.

L'ensemble de cette partie de résultats prouve que l'amélioration de l'activité hydrogénase est dépendante de nombreux facteurs biologiques. Pour lever ces verrous, de nombreuses manipulations génétiques et modifications environnementales sont nécessaires. La caractérisation de ces étapes et la découverte de partenaires de l'hydrogénase nous permettrait de continuer à améliorer la photo-production. On peut constater qu'actuellement on connaît peu de processus impliqués dans la maturation de l'hydrogénase. Ces processus se focalisent sur la maturation de la sous-unité HoxH or vu la complexité de l'hydrogénase, d'autres facteurs et partenaires biologiques doivent intervenir dans le métabolisme de l'hydrogène. L'analyse des mutants construits dans cette thèse, par transcriptomique et protéomique pourra sûrement révéler de nouveaux acteurs impliqués dans le métabolisme de l'hydrogène chez *Synechocystis* et permettre de mieux comprendre sa place et son rôle dans le métabolisme global cyanobactérien.

2. Analyse du rôle de l'hydrogénase

En parallèle, nous avons également cherché à comprendre le rôle biologique de l'hydrogénase. Plusieurs rôles ont été proposés dans la littérature : l'un de ces rôles est qu'elle agirait comme une valve pour évacuer l'excès d'électrons créé par la photosynthèse. Dans cette optique l'hydrogénase pourrait agir comme un mécanisme de défense contre le stress oxydant. Pour tester cette hypothèse, nous avons construit un nouveau mutant (Δ hox) de délétion de l'opéron *hoxEFUYH*, en remplaçant tout l'opéron *hox* par une cassette de résistance à la kanamycine. La délétion de l'opéron *hox* n'affecte pas la viabilité cellulaire, ce qui confirme que l'hydrogénase n'est pas essentielle à la croissance cellulaire dans les conditions du laboratoire (en lumière continue). Nous avons ensuite comparé la tolérance à un stress oxydant de type H₂O₂ chez les mutants Δ hox et CE1 (surexprimant l'opéron *hox*) avec le WT. Le H₂O₂ crée du stress oxydant, responsable de nombreux dommages cellulaires. Les résultats montrent que lorsque l'hydrogénase est absente, les cellules sont plus sensibles au H₂O₂ mais qu'au contraire lorsque l'on surexprime l'hydrogénase elles deviennent plus résistantes. Par contre lorsque les gènes *hyp* (assemblage) sont surexprimés, on a une diminution de la tolérance à ce stress, or en conditions normales les gènes *hyp* n'affectent pas la croissance. Ces données confirment que l'hydrogénase agit comme une protection contre le stress oxydant mais suggèrent que la surexpression des gènes *hyp* diminue cette protection. On peut supposer que certains des gènes *hyp* sont impliqués dans d'autres processus et que leur surexpression entraînerait la diminution de la tolérance au H₂O₂.

Dans la continuité, nous avons regardé l'influence de l'hydrogénase sur la croissance en glucose et glycérol (substrat économique). En effet chez *Arthrospira*

maxima l'ajout de glucose bien toxique pour la souche WT (Narainsamy *et al.*, 2013) stimule la production d'hydrogène. Ceci peut être dû à la diminution des électrons consommés par le cycle de Calvin, ce qui génère un surplus d'électrons qui recombinent avec l'oxygène pour créer des ROS et par conséquent du stress oxydant. Dans ces conditions l'hydrogénase intervient pour évacuer ce surplus d'électrons. Lorsque les mutants de délétion (Δhox) ou de surexpression de l'hydrogénase (CE1, CE2, CE4) poussent en glucose ou glycérol, on observe qu'en absence d'hydrogénase (Δhox) ce stress oxydant est d'autant plus toxique pour la cellule. Tandis que l'augmentation d'hydrogénase active (CE1) rend les cellules plus résistantes, ce résultat se confirme pour le glucose et le glycérol. Pour ce test, on remarque également que le mutant CE2 (qui surexprime l'opéron *hox* et les gènes *hyp* simultanément) ainsi que le mutant CE4 (qui surexprime l'opéron *hox* et *hoxW*) sont autant résistants que le mutant CE1, ce qui suggère qu'ils n'interviennent pas dans la tolérance de ce type de stress. Ceci est étonnant si on compare ces résultats au phénotype obtenu en H_2O_2 , mais peut signifier que les gènes *hyp* interviennent avec des modes différents, ou que les protéines Hyp sont soumises à une régulation post-traductionnelle en fonction du stress oxydant auquel les cellules sont soumises (ex : H_2O_2 , glucose ou glycérol).

3. La régulation de la production d'hydrogène

Au cours de ce travail nous avons également caractérisé un régulateur négatif de l'hydrogénase : AbrB2, qui se fixe sur le promoteur de l'opéron *hox* et le régule négativement (Article II dont je suis co-auteur). De plus, nous avons décrit pour la première fois que ce régulateur subit une modification post-traductionnelle qui module son activité régulatrice en fonction du niveau de stress oxydant (Article III dont je suis co-auteur). Nous avons également mesuré l'activité hydrogénase après la délétion de ce régulateur, les résultats montrent une augmentation seulement d'un facteur deux par rapport à la souche WT, ce qui confirme que d'autres facteurs sont limitants.

Dans cet objectif, nous avons analysé un mutant délété du répresseur AbrB2 qui surexprime l'opéron *hox* (CE- $\Delta abrB2$). Ce mutant montre une tolérance au nickel et au diamide plus importante que le WT et $\Delta abrB2$ mais dont l'activité hydrogénase reste inférieure. Ces résultats préliminaires suscitent des questionnements quant aux autres facteurs de régulation qui pourraient intervenir dans la régulation de l'activité hydrogénase quand *abrB2* est absent.

4. Conclusion

Dans ces travaux effectués au cours de ma thèse, nous avons développé plusieurs stratégies complémentaires pour augmenter la production d'hydrogène chez *Synechocystis*. Nous avons mis en relief de nombreux points à améliorer pour augmenter l'activité hydrogénase, ce qui nous a permis d'obtenir des mutants avec un gain jusqu'à 20 fois plus important comparé au WT dans les conditions standard. De plus on a pu démontrer que l'hydrogénase agit comme protection contre le stress oxydant, mais que les gènes *hyp* ne sont pas impliqués ou régulent négativement cette tolérance.

Par ailleurs, nous avons également caractérisé un régulateur négatif de l'hydrogénase AbrB2 qui est lui même régulé par une modification post-traductionnelle de glutathionylation.

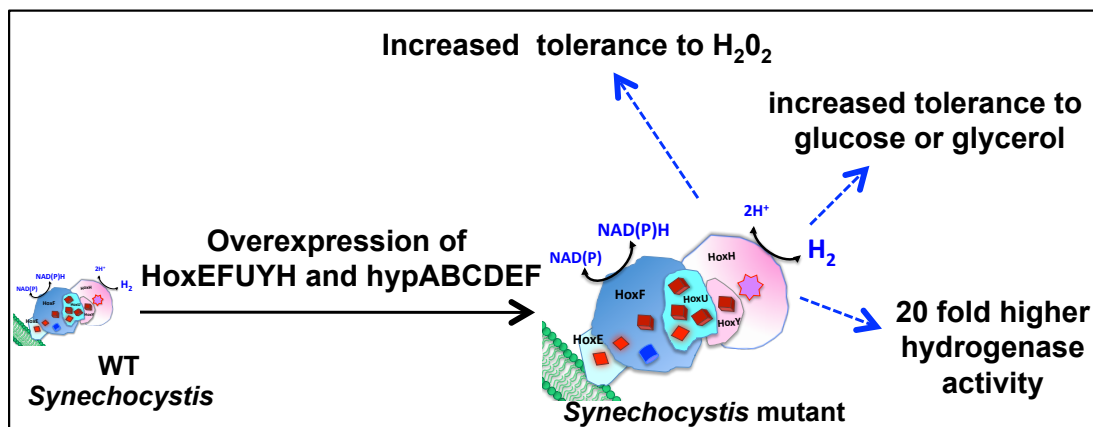


Figure 52 : Résumé des effets de la surexpression des gènes hox et hyp sur la physiologie de *Synechocystis*

Perspectives

Dans le domaine des bioénergies, la production d'hydrogène est une voie en plein essor et très prometteuse. L'avantage de l'hydrogène réside dans sa très haute conversion énergétique et sa séparation naturelle de la biomasse qui facilite son extraction. La photo-production d'hydrogène par des microorganismes photosynthétiques, en particulier les cyanobactéries, présente des applications potentielles mais leur mise en œuvre se heurte à de nombreux verrous biologiques.

VERROUS BIOLOGIQUES

Une limitation majeure de la photo-production d'hydrogène chez les cyanobactéries (mais aussi chez les algues) est l'inhibition de l'hydrogénase par l'oxygène. Il existe malgré tout des hydrogénases à centre actif [NiFe] naturellement tolérantes à l'oxygène qui peuvent catalyser la réaction de production d'hydrogène (Liebgott *et al.*, 2010). C'est le cas de l'hydrogénase de *Ralstonia eutropha* ou *Desulfovibrio fructosovorans*. De nombreuses équipes essayent de comprendre par quels mécanismes ces hydrogénases deviennent tolérantes à l'oxygène. Une des hypothèses repose sur le canal de diffusion de l'hydrogène au site actif, qui semble plus restreint dans les hydrogénases tolérantes, ce qui empêcherait l'oxygène d'atteindre le site actif et l'inhiber. Construire un mutant qui surexprime par notre système une hydrogénase active tolérante à l'oxygène serait une avancée considérable pour la photo-production d'hydrogène par des micro-organismes.

D'un autre point de vue, la purification de l'hydrogénase chez *Synechocystis* en grande quantité n'est pas encore réalisé en raison de sa faible expression dans la souche sauvage dans les conditions standard et au nombre important de sous-unités. Utiliser les mutants de surproduction construits au cours de ma thèse pourrait faciliter la purification de l'hydrogénase Hox. Cette purification pourrait permettre d'obtenir des quantités suffisantes pour réaliser sa structure cristallographique, afin de déterminer les points clés pour améliorer sa tolérance à l'oxygène, et de mieux comprendre son assemblage.

VOIES COMPETITRICES

D'autre part l'hydrogénase est dépendante du flux d'électrons issus de la photosynthèse, or une majorité de ces électrons sont également utilisés par d'autres voies métaboliques compétitrices comme l'assimilation de l'azote et du soufre ou le métabolisme du carbone. Une infime partie de ces électrons est alors acheminée vers l'hydrogénase. Si on veut améliorer la photoproduction d'hydrogène chez *Synechocystis*, il est nécessaire d'augmenter la quantité d'hydrogénase active mais également de lui apporter les électrons nécessaires pour son activité.

Des travaux montrent que si on bloque certaines de ces voies, la production d'hydrogène augmente. Le donneur primaire d'électrons de l'hydrogénase est le NAD(P)⁺/NAD(P)H, qui est également utilisé par la voie de fixation du CO₂ et par le

complexe I respiratoire (NDH-1) codé par les gènes *ndh*. La délétion du gène *ndhB* (noyau du complexe NDH-1) dans le mutant M55 (Cournac *et al.*, 2004) montre qu'il produit peu d'O₂ et présente une faible capacité de fixation du CO₂, ce qui permet de produire de l'hydrogène par photo-production (différent de l'activité hydrogénase qui mesure la quantité d'hydrogénase active) pendant plusieurs minutes contrairement à la souche WT. Ceci est dû à l'augmentation du ratio NAD(P)⁺/NAD(P)H qui est normalement à 50% chez le WT mais presque à 100% chez le mutant M55 ce qui favorise l'activité de l'hydrogénase puisque qu'elle produit de l'hydrogène lorsque le niveau de NAD(P)⁺ est élevée (Cooley and Vermaas, 2001). Cette mutation pourrait donc être favorable dans un mutant de surproduction de l'hydrogénase pour une photo-production durable.

Une autre étude sur la voie d'assimilation de l'azote (Baebprasert *et al.*, 2011) montre que lorsque l'on bloque cette voie par délétion soit de la nitrate réductase (*narB*) soit de la nitrite réductase (*nirB*), l'activité hydrogénase (quantité d'hydrogénase active) et la photoproduction d'hydrogène sont plus élevées dans ces mutants comparé au WT. Ces augmentations ne sont pas dues à un changement transcriptionnel des gènes *hox* mais à une redirection des électrons vers l'hydrogénase.

ROLE BIOLOGIQUE

Comprendre les aspects fondamentaux de l'hydrogénase de *Synechocystis* afin de l'utiliser à des fins appliquées nécessite cependant de mieux comprendre le rôle et la place de l'hydrogénase dans le métabolisme de *Synechocystis*. Comme démontré précédemment, l'hydrogénase agit comme un mécanisme de défense contre le stress oxydant, étonnamment la surexpression des gènes *hyp* va inhiber cette tolérance dans certaines conditions oxydantes. Peu de données sont disponibles sur le rôle des gènes *hyp*, mais d'après les résultats précédents ils sont essentiels à l'augmentation d'hydrogénase active. Il serait donc intéressant de construire des mutants de délétion de ces gènes pour trouver d'autres rôles dans lesquels ils seraient impliqués en particulier vis-à-vis du stress oxydant. Par ailleurs, l'hydrogénase pourrait être également impliquée dans la réponse à d'autres stress comme le stress osmotique, métallique ou thermique : il serait donc intéressant de tester d'autres stress sur les mutants construits dans ces travaux.

On a pu constater dans les tests de tolérance en glucose et glycérol, que les cellules formaient des agrégats les premiers jours d'incubation et que dans les souches de surexpression de l'hydrogénase, il y avait plus de cellules et donc plus d'agrégat. Ces observations suggèrent que les cellules se protègent du stress oxydant grâce à ces agrégats. En effet, les cellules qui sont enfouies dans les agrégats vont pouvoir se protéger de la lumière (qui leur permet d'effectuer la photosynthèse qui dégage de l'oxygène) et évacuer le stress oxydant grâce à l'hydrogénase. Par conséquent, l'abondance plus importante d'hydrogénase active dans les mutants les rend plus résistantes. Des études menées au laboratoire montrent que *Synechocystis* produit des biofilms qui forment un réseau important permettant de connecter les cellules entre elles et sûrement de communiquer (Jittawuttipoka *et al.*, 2013). On peut donc émettre l'hypothèse que la production d'hydrogène dans l'environnement naturel de *Synechocystis* est possible grâce en partie à la production de biofilms qui protège l'hydrogénase de l'oxygène environnant. Mesurer la photoproduction dans les biofilms

avec les différentes souches construites pourrait permettre de confirmer cette hypothèse.

REGULATION POST-TRADUCTIONNELLE

Les études au cours de ma thèse sur régulateur négatif AbrB2 ont permis de révéler pour la première fois un processus de régulation post-traductionnelle par glutathionylation (qui crée un pont disulfure entre la cystéine d'AbrB2 et la cystéine du glutathion) qui régule l'activité d'AbrB2 en fonction du niveau de stress oxydant. La glutathionylation est un mécanisme de protection des protéines au niveau de leur cystéine contre le stress oxydant, mais également de régulation. Ce processus peut aussi intervenir dans d'autres protéines de la production d'hydrogène comme les protéines Hox ou Hyp, ce qui ouvrirait la voie à une régulation post-traductionnelle encore inconnue.

RECHERCHE DE NOUVEAUX PARTENAIRES

Le métabolisme de l'hydrogène est clairement imbriqué dans le métabolisme global de *Synechocystis* mais on possède peu d'information sur les partenaires de l'hydrogénase. Des études transcriptomiques sur le mutant Δ abrB2 montrent qu'il serait impliqué dans la régulation de nombreux processus de transport et de protection contre le stress oxydant, mais il révèle également de nombreux gènes inconnus qui pourraient être liés à la production d'hydrogène. Analyser les mutants de délétion et de surproduction de l'hydrogénase par des techniques de transcriptomique et protéomique pourrait dévoiler des acteurs encore inconnus du métabolisme de l'hydrogène comme des gènes de maturation de la partie diaphorase ou de la sous-unité HoxY (encore inconnus).

CONCLUSIONS

Le métabolisme de production d'hydrogène chez la cyanobactérie *Synechocystis* soulève de nombreuses questions du point de vue fondamental et appliqué. Répondre à ces questions est un challenge pour la connaissance scientifique de ces microorganismes et leur évolution, mais également pour répondre à des enjeux énergétiques actuels. L'ensemble de mes travaux de thèse ont permis d'élargir les connaissances sur la production d'hydrogène chez *Synechocystis* et d'ouvrir la porte à de nouvelles voies de recherche.

Matériels et Méthodes

Références

Annexes

MATERIELS

SOUCHES ET MILIEUX DE CULTURE

Synechocystis sp. PCC6803

La souche de *Synechocystis* PCC6803 provient de la collection de l'institut Pasteur (Paris). En condition standard, elle est cultivée à 30°C dans le milieu minéral (MM) qui correspond à du BG-11 (Rippka *et al.*, 1979) supplémenté avec 3,8 mM de Na₂CO₃ (Labarre *et al.*, 1989), tamponné à pH=7 avec 3 mM d'HEPES (acide N-2 hydroxyéthylepipérazine-N'-éthane-sulfonique)(voir composition dans l'annexe I). Les cultures sont effectuées en milieu liquide, dans un agitateur orbital à rampes lumineuses (Infors HT Multitron) ou sur milieu solide, obtenu par ajout de 10 g/L de Bacto Agar (Difco). La lumière blanche est obtenue par des tubes néons (Sylvania, cool white) et l'intensité lumineuse standard de culture est fixée à 2500 lux. Elle est mesurée à l'aide d'un Luxmètre (TESTO 545 AG). La concentration cellulaire est déterminée par turbidité à 580nm (une unité de Densité Optique (DO) correspondant à 5.10⁷ cellules/ml). La vitesse de croissance de la souche de type sauvage (temps de doublement du nombre de cellules) est d'environ 10 h à 2500 lux. Les antibiotiques utilisés pour sélectionner la présence de plasmides d'expression ou de cassettes de délétion sont indiqués dans le Tableau 5.

Souches E. coli

La souche *E.coli* TOP 10 (Invitrogen) {F- *mcrA* (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*) *80lacZM15 lacX74 recA1 ara139* (*ara-leu*) 7697 *galU galK rpsL* (*StrR*) *endA1 nupG*} a été utilisée pour les clonages, les constructions génétiques et amplifications de plasmides. Elle est cultivée soit à 30°C, soit à 37°C en milieu LB (Luria Bertani) contenant les antibiotiques adéquats, indiqués sur le Tableau 5.

La souche *E. coli* CM404 dérivée de la souche HB101 possède le plasmide mobilisateur pRK2013 (Kmr) (Powel *et al.*, 1989) nécessaire pour conjuguer *Synechocystis*. La réplication du vecteur pRK2013(Kmr) étant thermosensible, la souche CM404 doit être cultivée à 30°C (Marraccini *et al.*, 1993 ; Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994).

La souche *E.coli* DH5α {F- *φ80lacZAM15 Δ((lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17*(*rk-*, *mk+*) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ*} a été utilisée pour les clonages, amplifications et purification de plasmides. La souche DH5α est cultivée soit à 30°C, soit à 37°C en milieu LB (Luria Bertani) contenant les antibiotiques adéquats, indiqués dans le Tableau 5.

	Souche		
Antibiotique	E.coli TOP 10	E.coli DH5α	Synechocystis
Ampicilline (Amp)	100 µg/ml	100 µg/ml	
Kanamycine (Km)	50 µg/ml	50 µg/ml	50 - 300 µg/ml
Streptomycine (Sm)	25 µg/ml	25 µg/ml	2,5- 5 µg/ml
Spectinomycine (Sp)	75 µg/ml	75 µg/ml	2,5- 5 µg/ml
Gentamycine (Gm)	30 µg/ml	30 µg/ml	2,5-5 µg/ml

Tableau 5: Concentration des antibiotiques utilisés (la streptomycine et spectinomycine sont utilisées conjointement)

PLASMIDES

pGEM-T

Le vecteur pGEM-T (Promega ; Figure 53) est utilisé pour cloner des produits de PCR. Les extrémités protudantes T en 3' créées par Promega après digestion avec EcoRV permettent de cloner les produits PCR synthétisés par la *Taq* polymérase qui ajoute fréquemment un A aux extrémités 3'. La présence des extrémités protrudantes empêche la recircularisation du plasmide. Par ailleurs, Le pGEM-T est un vecteur « haut nombre de copies » ayant *oriC* comme origine de répllication, le gène *Amp^r* codant pour la résistance à l'ampicilline, un site multiple de clonage (MCS).

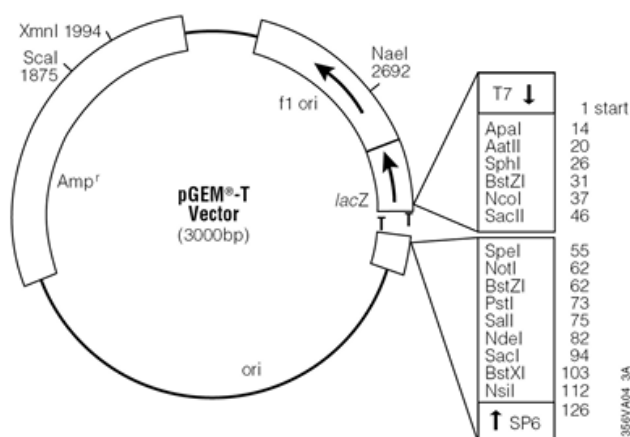


Figure 53 : Le plasmide pGEM-T (Promega)

pUC19

Le vecteur pUC19 (Figure 54) est utilisé pour cloner des produits de PCR. Ils sont préparés par le fournisseur life technologies. pUC19 est un vecteur « haut nombre de copies » ayant *pMB1* comme origine de répllication, le gène *Amp^r* codant pour la résistance à l'ampicilline, des sites multiples de clonage (MCS), de l'opérateur lac suivi d'une sous-unité de la β -galactosidase.

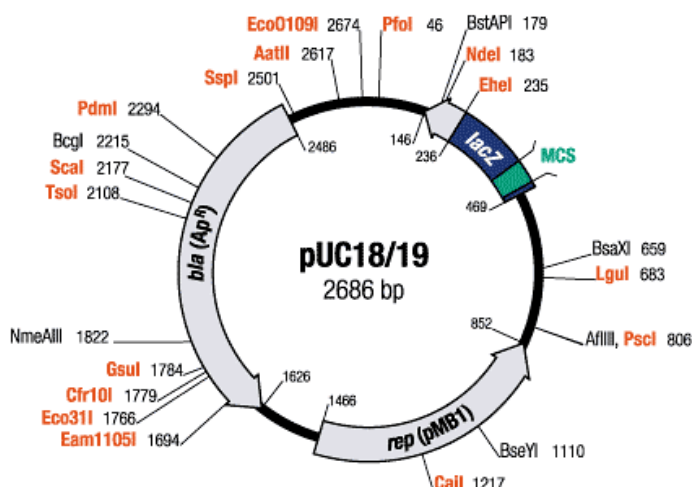


Figure 54 : Le plasmide pUC19 (revendu par Life technologies)

pFCI

Le plasmide pFC1 (Figure 55) a été construit au laboratoire (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994). Ce plasmide possède la machinerie de réplication issue du plasmide à large spectre d'hôte RSF1010, et les signaux de thermorégulation de l'expression génique provenant du bactériophage lambda. Les cellules qui ont reçu le plasmide deviennent résistantes à la streptomycine (Sm) et au chloramphénicol (Cm) et répliquent pFC1 de façon stable. De plus, il contient une cassette d'expression thermorégulée qui comporte le promoteur fort (p_R) dont l'activité est contrôlée par un répresseur thermosensible (cl_{857}) adjacent au promoteur p_R .

Si la phase codante d'un gène est clonée au site de restriction *NdeI* (CATATG) qui reconstitue le codon initiateur (ATG) de la traduction, l'expression de ce gène est alors gouvernée par le promoteur fort, *pR*, qui est lui-même contrôlé par le répresseur thermosensible codé par le gène *cl857*.

Grâce à ce système, la phase codante pour la protéine d'intérêt fusionnée au site *NdeI* adjacent au promoteur p_R aura son expression augmentée proportionnellement à la température de croissance :

- Pas d'expression à température inférieure ou égale à 30°C
- Expression modérée à 33-35°C
- Forte expression à 39°C (température à laquelle les cellules sauvages poussent avec le même temps de génération qu'à 30°C).
-

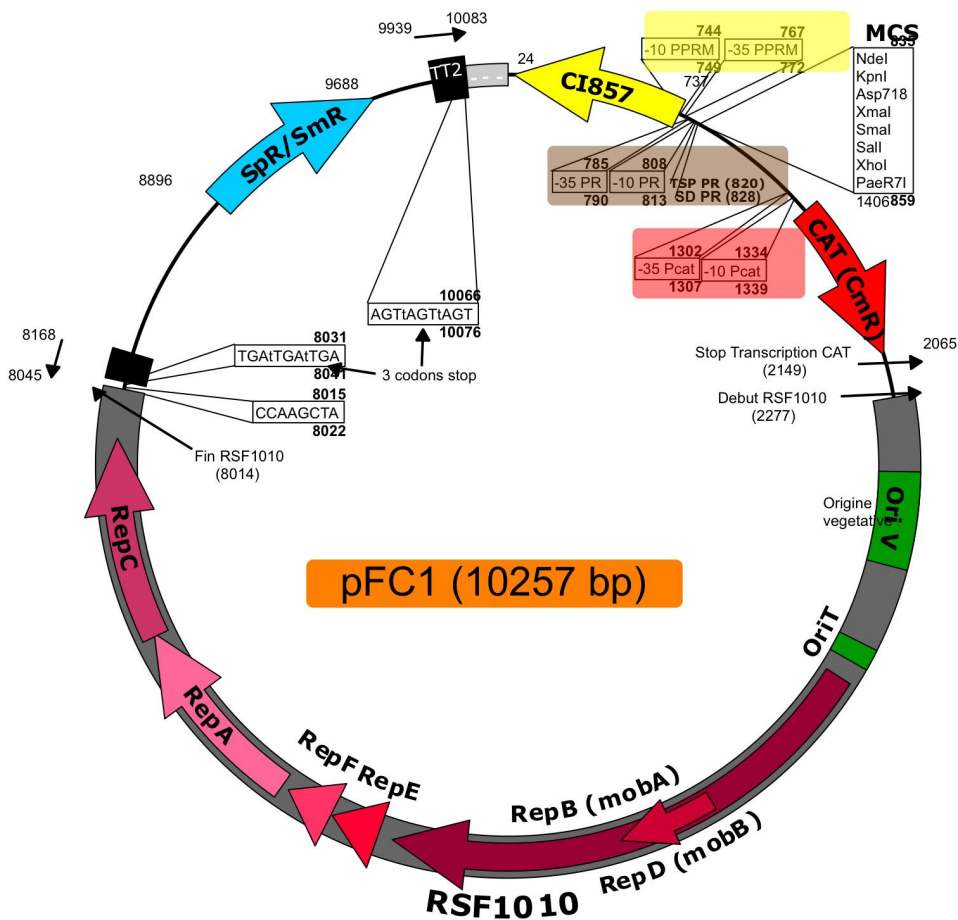


Figure 55 : Le plasmide pFCI

METHODES

BIOLOGIE MOLECULAIRE

Resuspension et dosage des acides nucléiques

Les fragments PCR, plasmides et préparation d'ARN sont resuspendus dans un tampon T0,1E (Tris HCl, 10mM, pH=7,5 ; EDTA, 0,1mM). Le principe du dosage de la quantité d'ADN ou d'ARN est de mesurer l'absorbance de la solution contenant l'ADN ou l'ARN grâce à un rayon de longueur d'onde de 260 nm à l'aide d'un spectromètre *Nanodrop* (ThermoScientific). L'ADN et l'ARN ont leur maximum d'absorbance à 260 nm (1 unité de DO correspond à 50 µg/ml d'ADN et 40 µg/ml pour les ARN). Le rapport DO_{260nm} / DO_{280nm} permet de déterminer la pureté de la préparation ; il doit être égal à 1,8 pour une solution d'ADN.

Extraction et purification d'acides nucléiques

Extraction d'ADN plasmidique d'*E. coli*

Les plasmides ont été purifiés à partir d'*E. coli*, à l'aide du Kit NucleoSpin Plasmid de Macherey-Nagel avec 2 ml de cellules incubés pendant 12 h à 30°C (pour les cellules contenant pFC1) ou 37°C (pour les cellules contenant pGEM-T ou pUC19). L'ADN est resuspendu dans un tampon T0,1E (Tris 10 mM- EDTA 0.1 mM) ou le tampon d'élution fourni par le kit (Tris HCl, 5mM, pH8).

Extraction d'ADN génomique de *Synechocystis*

L'ADN génomique de *Synechocystis* est extrait à partir d'une culture liquide (500 ml) en phase exponentielle de croissance ($A_{580nm}=0,7$), selon la méthode décrite par Labarre *et al.*, en 1989.

Extraction des ARN totaux de *Synechocystis*

Les ARN totaux de *Synechocystis* ont été préparés comme suit :

50 à 150 ml de culture en milieu de phase exponentielle de croissance ($DO_{580nm} = 0,6$) sont dilués dans un milieu préchauffé, et maintenu à 30°C ou 39°C, pendant 48 h afin d'atteindre une $DO_{580nm} \sim 1$. Les cellules sont récoltées par filtration sous vide, resuspendues dans 2 ml de Tris HCl 50mM pH8 puis déposées dans des presse d'Eaton préalablement refroidies dans à un mélange éthanol/carboglace (-80°C) et cassées à 250 MPa. Les ARN totaux sont isolés avec le kit RNeasy (QIAGEN), traités deux fois avec la Dnase I (AMBION, Dnase I RNase Free, 1 h à 37°C) après purification sur colonnes RNeasy, et précipités avec 0,1 volume d'acétate de sodium 3M et 3 volumes d'éthanol. Après centrifugation, les ARN sont resuspendus dans l'H₂O, dosés par absorption, vérifiés par migration dans un gel d'agarose 1,2%, et stockés à -80°C.

Amplification d'ADN par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

La technique de PCR a été utilisée pour :

- amplifier les cassettes de délétions
- vérifier les constructions génétiques (taille, orientation et séquence) avant et après propagation chez *Synechocystis*.

Les PCR sont réalisées à partir de cellules entières (PCR sur colonie) soit avec:

- la *Taq* DNA polymérase d'Invitrogen®

- la Phusion High-Fidelity DNA Polymerase de ThermoScientific® (polymérase qui possède une activité processive permettant de corriger des erreurs de réplication sur une longueur importante (5 kb – 10 kb).

Le mélange de réaction suit le protocole fourni par le fabricant avec les oligonucléotides amorces adéquats.

Dans le cas de PCR sur "colonie", une étape préalable peut être nécessaire pour fragiliser les membranes et libérer l'ADN génomique: 10µl de suspension cellulaire sont chauffés selon le cycle suivant : 5 min à 96°C, 1 min 30 à 50°C, 1 min 30 à 96°C, 1 min à 45°C, 1 min 96°C, 1 min 40°C.

PCR d'assemblage

Le principe de la PCR d'assemblage comprend 2 étapes (Figure 56) :

- Une PCR pour amplifier deux régions chromosomiques (1 et 2) de *Synechocystis* avec une plateforme d'homologie (environ une dizaine de nucléotides complémentaires) du côté 3' de la première région chromosomique (1) et du côté 5' de l'autre région chromosomique (2) ;
- Une PCR d'assemblage servant à assembler les deux régions chromosomiques grâce à cette plateforme d'homologie et aux oligo 5' de la région 1 et 3' de la région 2.

Etape 1: PCR d'amplification des deux régions R1 et R2



Etape 2: PCR d'assemblage des deux régions R1 et R2 par la zone d'homologie H

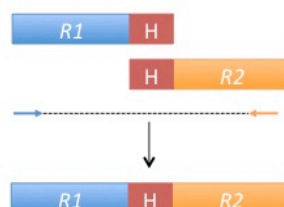


Figure 56 : Principe de la PCR d'assemblage

PCR quantitative (RT-QPCR)

Synthèse des ADN complémentaires

Pour synthétiser les ADNc par reverse transcription, le kit M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen) est utilisé avec la Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega), les Random Primer (Amersham Biosciences) et la Rnase H (Ambion). On suit le protocole du fabricant de la reverse transcriptase en utilisant 5 µg d'ARN, puis on stocke les ADNc à -20°C.

Préparation de la qPCR

La qPCR est préparée avec le kit MESA GREEN qPCR MasterMix Plus (Eurogentec).

37,5 µg d'ADNc sont dilués dans 150 µl (dilution 0) puis sont dilués successivement 6 fois d'un facteur 4. Pour la gamme étalon on choisit les dilutions 1 à 6, pour les échantillons on choisit les dilutions adéquates en fonction des résultats attendus. On dépose 5 µl d'échantillons dilués sur la plaque 96 puits et on ajoute le mix SYBR selon le protocole du fabricant. La plaque est ensuite recouverte d'un film plastique et incubée dans le thermocycleur iQ5 optical system (Biorad). On lance le programme adapté à nos échantillons, à la fin du programme, les données sont récupérées et analysées soit avec le programme du fabricant ou avec Excel (Microsoft). Les fragments PCR générés varient entre 163 pb et 234 pb.

Purification d'un fragment ADN

Par purification sur colonne

Lorsqu'il n'y a pas d'amplification aspécifique par PCR et que les fragments sont de petite taille (< 8 kb), le mélange réactionnel PCR est déposé sur des colonnes QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) et le protocole du fournisseur est suivi, pour éliminer les oligos.

Par purification sur gel d'agarose

Lorsqu'il y a des amplifications aspécifiques après PCR ou lorsque les fragments sont de grande taille (> 8 kb) après digestion, on utilise la purification sur gel d'agarose.

Les fragments d'ADN obtenus après PCR sont chargés négativement à cause des groupements phosphates ionisables et vont pouvoir se déplacer sous l'effet d'un courant électrique de la cathode vers l'anode. On va mélanger nos fragments avec un tampon de charge (glycérol et bleu de bromophénol) puis les déposer sur un gel d'agarose qui forme une matrice plus ou moins dense selon sa concentration. La révélation de l'ADN se fait grâce au bromure d'Ethidium (BET) qui est une molécule intercalante et sous UV (312nm) le BET est fluorescent. Les bandes observées correspondent à l'ADN déposé dont on pourra estimer la taille grâce à un marqueur de taille. La bande d'ADN désirée est découpée sous UV puis purifiée sur colonne QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN).

Ligation - Transformation par choc thermique chez E. coli

La ligation se fait grâce à l'enzyme ADN ligase. Elle permet de relier deux séquences d'ADN entre elles par une liaison 5'phosphate-3' OH^- . Le protocole de ligation varie en fonction du fournisseur, au cours de ce travail le kit T4 DNA ligase d'Invitrogen® a été utilisé.

Une partie ou la totalité du mélange de ligation est ensuite utilisé pour transformer 100µl de cellules *E. coli* Top10 ou DH5α. Les cellules compétentes sont préparées avec du chlorure de rubidium (Hanahan, 1985, voir annexe 2). Le mélange ADN-cellules compétentes est incubé 30 minutes à 4°C (adsorption) puis les cellules compétentes sont transformées par choc thermique à 42°C pendant 1min30s (Top10) ou 45 sec (DH5α) puis à 4°C pendant 3 minutes. Une fois le choc thermique réalisé, du milieu LB est ajouté et les cellules sont incubées à 30°C ou 37°C pendant 1 heure, selon les plasmides à introduire. Les bactéries sont ensuite étalées sur milieu solide LB avec les antibiotiques adéquats. Les boîtes sont incubées durant une nuit à 30°C ou 37°C.

Réaction de séquence

Le séquençage a été réalisé avec le kit "Big-Dye" (Perkin Elmer®), en utilisant les amorces adéquates. Les séquences ont été analysées à l'aide du programme Sequencher V4.1 (Gene Codes Corporation®).

MANIPULATIONS GENETIQUES

Transformation et inactivation de gène chez *Synechocystis*

Principe

Le principe de transformation est possible grâce à la faculté de *Synechocystis* d'effectuer des recombinaisons génétiques entre séquences homologues d'ADN (Figure 57). La transformation va nous permettre de déléter une région chromosomique et la remplacer par une autre séquence d'ADN contenant un marqueur de sélection codant pour la résistance à un antibiotique. Cette séquence d'ADN contient de part et d'autre les 2 régions d'ADN flanquant de la région chromosomique à éliminer qui permettent la recombinaison homologue. Après recombinaison au niveau de ces plateformes d'homologie, équivalentes à un "double crossing-over", la cassette d'ADN s'intègre en lieu et place du gène à éliminer, sur une seule des dix copies du chromosome cyanobactérien qui est polyploïde (Labarre *et al.*, 1989). Cela suffit à conférer la résistance à l'antibiotique codée par le gène marqueur. Ensuite, selon que le gène à éliminer est essentiel, ou pas, à la croissance des cellules, il est possible, ou pas, d'obtenir des cellules ne possédant que des copies mutantes du chromosome. C'est dans ce but, qu'on augmente progressivement la concentration de l'antibiotique sélectif, sans dépasser la dose qui tuerait même les cellules ne possédant que des copies mutantes du chromosome.

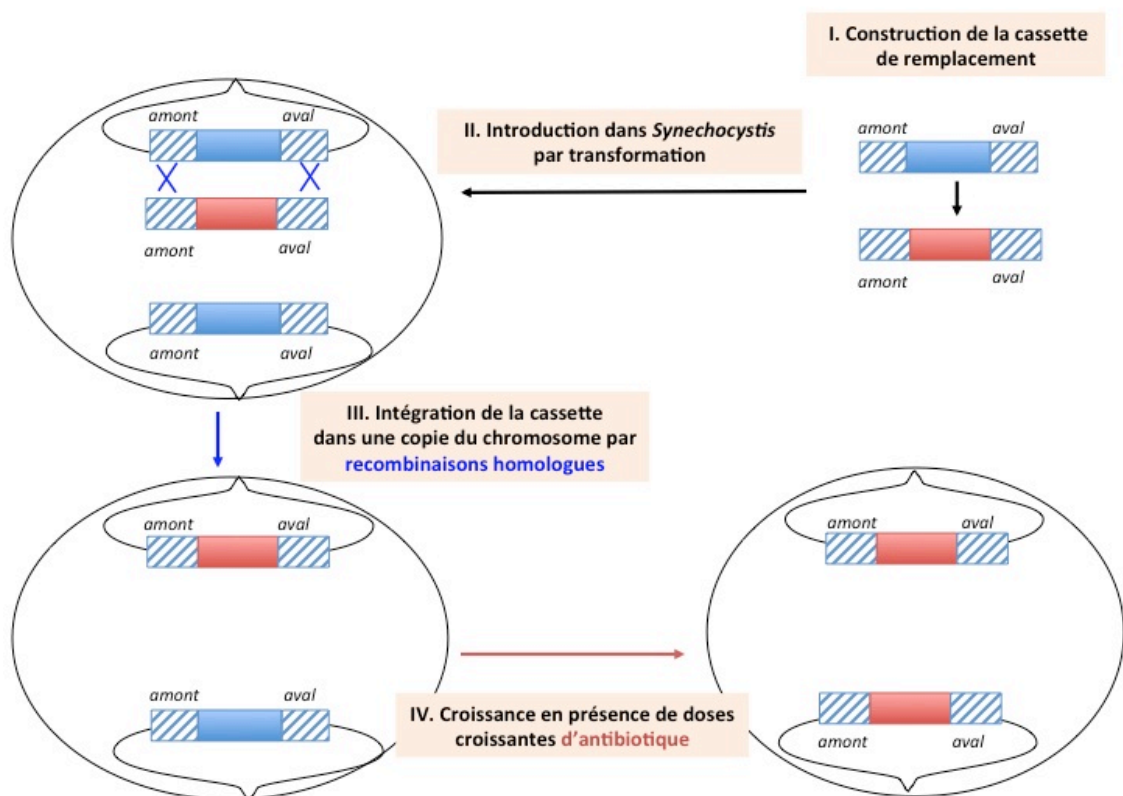


Figure 57 : Principe de la transformation chez *Synechocystis*

Protocole

Synechocystis est transformée selon le protocole du laboratoire décrit par Labarre *et al.*, 1989, 40 ml de cultures maintenus en milieu de phase exponentielle de croissance ($DO_{580nm} = 0,5$) par 3 repiquages successifs sont centrifugés (10mn à 10.000G), lavés avec 10 ml de milieu MM, et resuspendus dans 5 ml de milieu MM. 1 ml de cette suspension cellulaire est mélangé avec 1 μ g d'ADN dilué dans 100 μ l de T/0,1E pH7,5, et incubé 1h30 sans agitation dans les conditions standard de croissance. Les cellules sont étalées sur 10 boîtes (100 μ l par boîte) de milieu solide MM, puis incubées à 30°C à différentes intensités lumineuses. Après 20h de croissance dans les conditions standard, 0,4 ml de solution d'antibiotique sélectif à la concentration adéquate (voir Tableau 5) est ajouté sous l'agar. Les transformants apparaissent après 5 à 9 jours d'incubation en conditions standard. Ils sont repiqués sur de nouvelles boîtes MM contenant des doses croissantes d'antibiotiques de façon à favoriser la croissance des cellules possédant la plus grande proportion de copies mutantes du chromosome porteuses du gène marqueur.

Conjugaison de plasmide chez *Synechocystis*

Principe

On peut également manipuler *Synechocystis* avec les vecteurs réplicatifs du laboratoire (<http://publicationslist.org/franck.chauvat>) qui sont introduits chez *Synechocystis* par la technique de conjugaison développée au laboratoire (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994) (Figure 58). Ces plasmides vecteurs (pV) sont d'abord introduits par transformation chez *E. coli* CM404 qui porte déjà le plasmide conjugatif (pC) autotransférable, pRK2013, qui ne se réplique pas chez *Synechocystis*. Par contre, pRK2013 code pour les fonctions permettant le transfert dans *Synechocystis* des plasmides Pv, qui se répliquent à raison de 10 copies par cellule, c'est-à-dire 1 copie de plasmide par copie du chromosome cyanobactérien qui est polyploïde.

Protocole

Le plasmide vecteur à introduire chez *Synechocystis* est d'abord introduit par transformation dans la souche d'*E. coli* CM404 qui contient le plasmide conjugant pRK2013 nécessaire à l'introduction de plasmide chez *Synechocystis*. Les cellules sont cultivées à 30°C durant 16 heures en milieu LB contenant les antibiotiques sélectifs du plasmide. Ensuite, 3.10^8 de ces cellules CM404 sont mélangées à 3.10^8 cellules de *Synechocystis* en phase exponentielle de croissance (préalablement centrifugées et resuspendues dans 10 ml de MM), déposées sous forme de goutte (30 μ l) sur milieu MM solide. Après 1 jours de croissance sans pression de sélection, on prélève un échantillon de ces gouttes que l'on ré-étale sur milieu MM solide contenant le(s) antibiotique(s) sélectif(s). Les clones conjuguants apparaissent après une semaine de croissance.

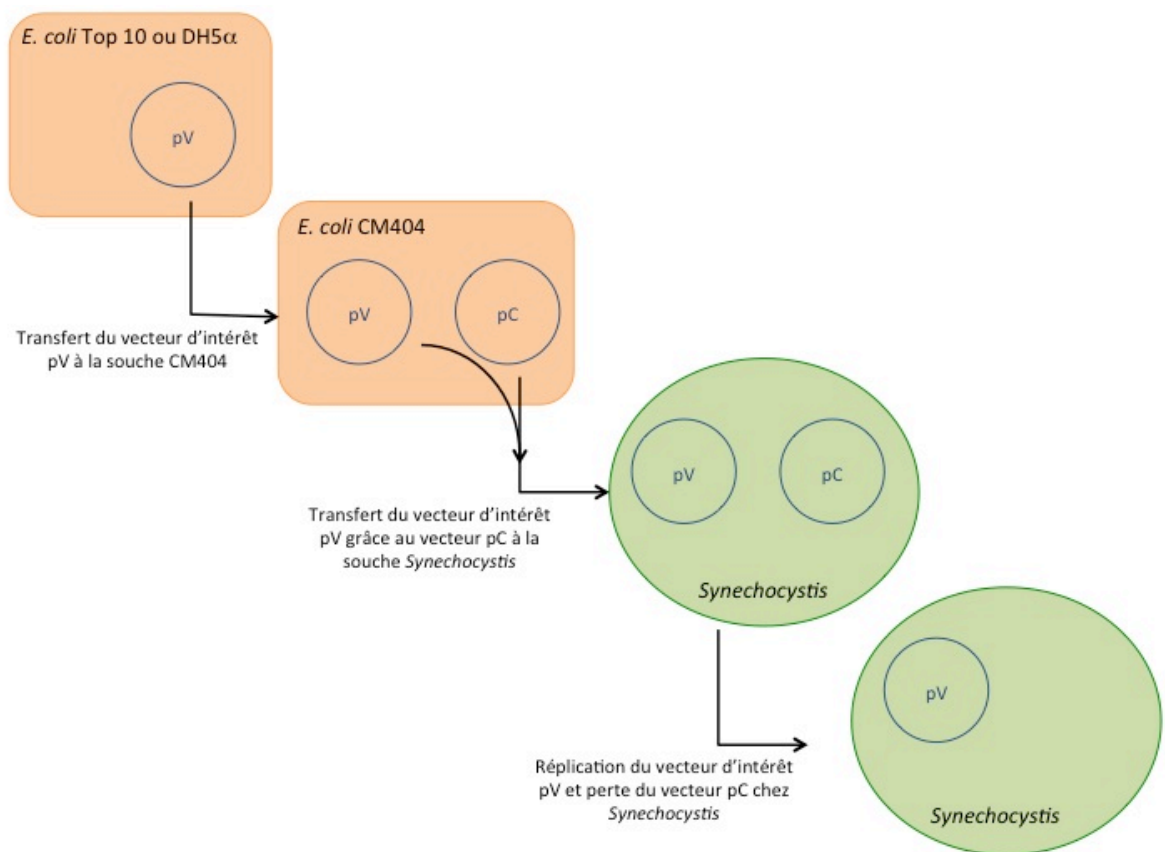


Figure 58 : Principe de la conjugaison chez *Synechocystis*

BIOCHIMIE

Purification des protéines et dosage de protéines

Extraction totale

Les protéines totales de *Synechocystis* ont été préparées comme suit :

50 ml de culture en milieu de phase exponentielle de croissance ($DO_{580nm} \approx 0,6$) sont dilués dans un milieu préchauffé, et maintenus à 30°C ou 39°C pendant 48h afin d'atteindre une $DO_{580nm} \sim 1$. Les cellules sont récoltées après centrifugation 15 min 3500g et resuspendues dans 2 ml tampon de cassage (Tris HCl 50mM pH 7,5, glycérol 5%, inhibiteur de protéase). Les cellules sont congelées dans des presses d'Eaton préalablement refroidies dans un mélange éthanol/carboglace (-80°C), puis cassées à 250 MPa. Le lysat est centrifugé 10 minute à 5000 G à 4° C pour éliminer les débris cellulaires et les cellules non cassées. On récupère le surnageant qui contient les protéines totales qui peuvent être stockées à -80°C.

Pour séparer les protéines solubles et les protéines membranaires : les protéines totales sont soumises à une ultracentrifugation 1h30 à 170 000G. Les protéines membranaires se retrouvent dans le culot et les protéines solubles dans le surnageant.

Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Les dosages ont été réalisés selon les indications du fournisseur (BIORAD, (Bradford,

1976)). La gamme étalon est obtenue à partir de la solution standard SAB (Sérum Albumine Bovine) avec 10 mesures de 1 à 10 µg/ml. Deux ou trois mesures par échantillon sont effectuées pour obtenir une mesure fiable de la quantité de protéines.

Purification au TCA

Pour obtenir des protéines purifiées, les protéines totales, membranaires ou solubles sont précipitées au TCA. Pour cela, un volume de protéine (V1, en fonction de la concentration désirée) est incubé avec 10% de TCA pendant 1min à 4°C, puis centrifugé 10 000G pendant 1 min à 4°C, le surnageant est totalement retiré, 100 µl d'acétone à 100% sont ajoutés au culot qui est à nouveau centrifugé à 10 000G pendant 1 min à 4°C et le surnageant est totalement retiré. Les protéines sont incubées avec un volume V2 (en fonction de la concentration désirée) de tampon de charge (Tris HCL 10mM pH 8,8, EDTA 2mM, LIDS 6%, βmercapto-Ethanol 8%, bleu de migration) pendant 1 heure à température ambiante, ces protéines peuvent être congelées à -20°C.

Western Blot

Migration des protéines sur gel SDS-PAGE

Les protéines purifiées au TCA sont déposées et migrées sur un gel SDS-PAGE 12% (ThermoScientific) dans le tampon de migration correspondant. Un gel de migration par anticorps doit être préparé.

Transfert sur membrane de nitrocellulose

Le transfert se fait selon le principe sur la Figure 59, soit sur des membranes de PVDF, soit de nitrocellulose, pour cela on utilise le pack i-Blot (Invitrogen) et on suit le protocole du fournisseur (le programme utilisé est : Programme 3 de 7 minutes). Une fois le transfert fini :

- on colore le gel au bleu de coomassie (pour vérifier la migration), puis décoloré avec une solution « destain » (acide acétique 10%, Ethanol 20% et eau 70%)
- la membrane est colorée au rouge ponceau 10 min (pour vérifier le transfert), puis décolorée à l'eau. Elle est ensuite incubée dans une solution de blocage (PBS 1X, Tween 0,1%, 5% lait) pendant 1 heure à température ambiante ou toute la nuit à 4°C

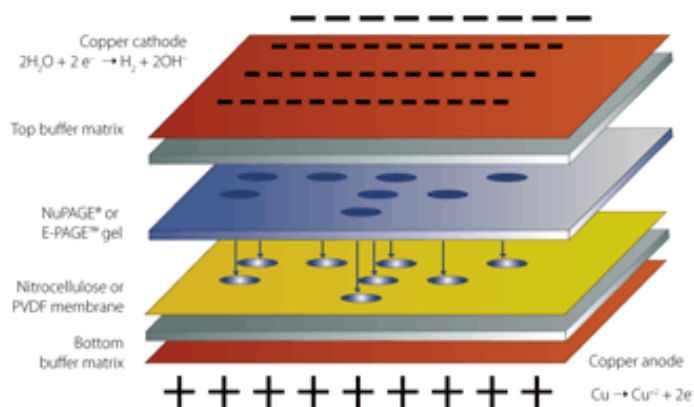


Figure 59 : principe du transfert avec le pack i-Blot (Invitrogen)

Hybridation des anticorps

Après le blocage, la membrane est lavée 4 fois au PBS 1X avec du Tween 0,1% pendant 5 min, elle est ensuite incubée pendant 1 à 2 heures avec les anticorps primaires préalablement dilués dans du PBS 1X, Tween 0,1% et 3% de lait. La membrane est lavée 4 fois au PBS 1X avec du Tween 0,1% pendant 5 min, puis incubée

pendant 1 heure à température ambiante avec des anticorps secondaires liés à une peroxydase (HPR). Pour finir la membrane est lavée 4 fois au PBS 1X avec du Tween 0,1% pendant 5 min, puis le signal de chemiluminescence émis par l'anticorps secondaire est détecté grâce à des réactifs ECL (GE Healthcare Amersham) sur des films photographiques (GE Healthcare Amersham).

Activité hydrogénasique

Principe

L'hydrogénase de *Synechocystis* étant réversiblement inhibée par l'oxygène, l'activité hydrogénasique (activité hydrogénase) se mesure dans un milieu anoxique, dans une boîte à gants anoxique (Jacomex ; $[O_2] < 2$ vpm) à l'intérieur de laquelle une électrode mesure la quantité d'hydrogène présent dans l'échantillon contenant les cellules, en fonction du temps. L'électrode utilisée est une électrode à oxygène qui a été modifiée pour mesurer de l'hydrogène (Electrode de Clark polarisé inversement ; Hansatech) (Figure 60). Grâce à elle, on mesure un courant électrique proportionnel à la concentration d'hydrogène dissous dans l'échantillon. Pour alimenter l'hydrogénase en électrons on ajoute aux échantillons (culots cellulaires resuspendus) un substrat artificiel spécifique (médiateur redox), le méthylviologène. Ce dernier est réduit par la dithionite qui est un réducteur très puissant. Les concentrations des "réactifs" ont été choisies afin de se trouver dans des conditions saturantes en substrat et de mesurer la vitesse maximale (V_{max}). Dans ces conditions expérimentales, la quantité d'hydrogénase par cellule sera proportionnelle à la vitesse mesurée. Le courant électrique mesuré est ensuite converti en une donnée graphique à l'aide d'un numériseur.

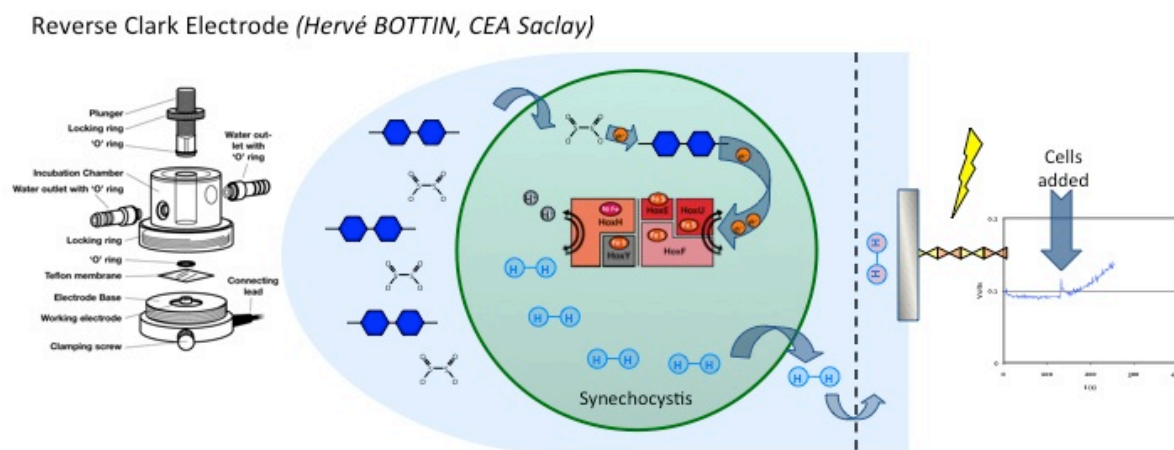


Figure 60 : Schéma de l'électrode à hydrogène et le principe de mesure de l'activité hydrogénase

Protocole

50 ml de culture en milieu de phase exponentielle de croissance ($DO_{580nm} \approx 0,6$) sont dilués 20 fois dans un milieu préchauffé, et remis en culture à 30°C ou 39°C, pendant 48h jusqu'à atteindre une $DO_{580nm} \sim 1$. Puis, 7 ml de cellules sont centrifugés 10 min 3500 x *g* et le culot est congelé à -80°C. Pour les mesures, les échantillons sont décongelés dans la boîte à gants anaérobie et resuspendus dans 175 μ L de Tris HCl 50 mM à pH 7,5. Les échantillons incubent ainsi 30 min à l'abri de la lumière et l' O_2 . Le courant est mesuré dans une solution contenant 5 mM de méthylviologène, 20 mM de

dithionite et 25 µL de cellules complété par du tampon Tris HCl 50 mM à pH 7,5 pour atteindre un volume total de 500 µl. La réaction est déclenchée par l'addition des cellules.

TESTS PHENOTYPIQUES

Test de tolérance aux métaux et aux agents oxydants

Sur milieu solide

Les souches analysées sont cultivées dans les conditions standard jusqu'à une DO_{580nm} de 0,5. Les suspensions sont diluées successivement 5 fois d'un facteur 4 dans le milieu MM (Figure 61). Les cellules sont alors déposées en gouttes de 10 µl sur des boîtes de milieu MM solidifiées par de l'Agar 1% (DIFCO) et contenant ou non des concentrations variées d'un toxique.

Au bout de 6-7 jours d'incubation à 30°C à 2500 lux, les boîtes sont visualisées. La tolérance des diverses souches est estimée en comparant le nombre de « gouttes » qui apparaissent : dans l'exemple ci-dessus, la souche mutante est plus résistante que la souche sauvage au toxique contenu dans la boîte de Pétri.

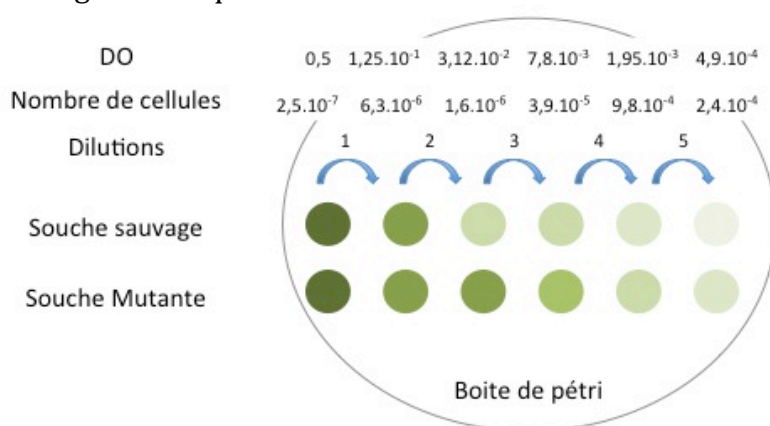


Figure 61 : Principe d'un test de tolérance sur milieu solide

Courbe de croissance en milieu liquide

Les cellules en phase exponentielle de croissance en milieu liquide MM (DO_{580nm} = 0,5) sont utilisées pour réensemencer des nouvelles cultures (DO_{580nm} initiale = 0,01 ou 0,02) à 30°C ou à 39°C :

- en milieu MM
- en milieu MM avec addition 2,5 µM de nickel ($NiSO_4$) et/ou 17 µM de fer ($FeCl_3$)
- en milieu MM avec addition de glucose (10mM)
- en milieu MM avec addition de glycérol (300µM)

La croissance est analysée par mesure régulière de la DO_{580nm} .

Test de survie en anaérobie

Les tests de survie au peroxyde d'hydrogène ont été faite en anaérobie.

50 ml de culture en milieu de phase exponentielle de croissance ($DO_{580nm} \approx 0,6$) sont dilués dans du MM, et maintenu à 30°C, pendant 48h afin d'atteindre une $DO_{580nm} \sim 1$. Puis, 10 ml de culture dilués à $OD_{580nm} = 0,5$ sont centrifugés à 10 min 3500G,

lavés deux fois avec 10 ml de MM. 1 ml des cellules lavées sont incubées 30 min dans la boîte à gant anaérobie, pour dégazer les cellules de l'oxygène. Puis, les cellules sont exposées à différentes concentrations de H_2O_2 et incubées 1 heure à 30°C et agitées à 700G à l'obscurité.

Les cellules sont ensuite diluées 5 fois de suite d'un facteur 5 dans le milieu MM. 50 ou 100µl de cellules à des dilutions appropriées sont alors étalées sur des boîtes de milieu MM solidifiées par de l'Agar 1% (DIFCO). Au bout de 6-7 jours d'incubation à 30°C à 2500 lux, les colonies sont comptées et le taux de survie est calculé en fonction du nombre de colonies obtenues aux différentes concentrations.

Analyse globale des pigments de *Synechocystis* PCC6803

Une culture en milieu de phase exponentielle est diluée pour obtenir une $DO_{800nm} = 0,1$. Un spectre est réalisé entre 350 et 800 nm sur 50 à 100 µl de culture (Spectrophotomètre DU640B de Beckman). Trois familles de pigments sont identifiables : caroténoïdes, phycobiliprotéines et chlorophylles (Figure 62).

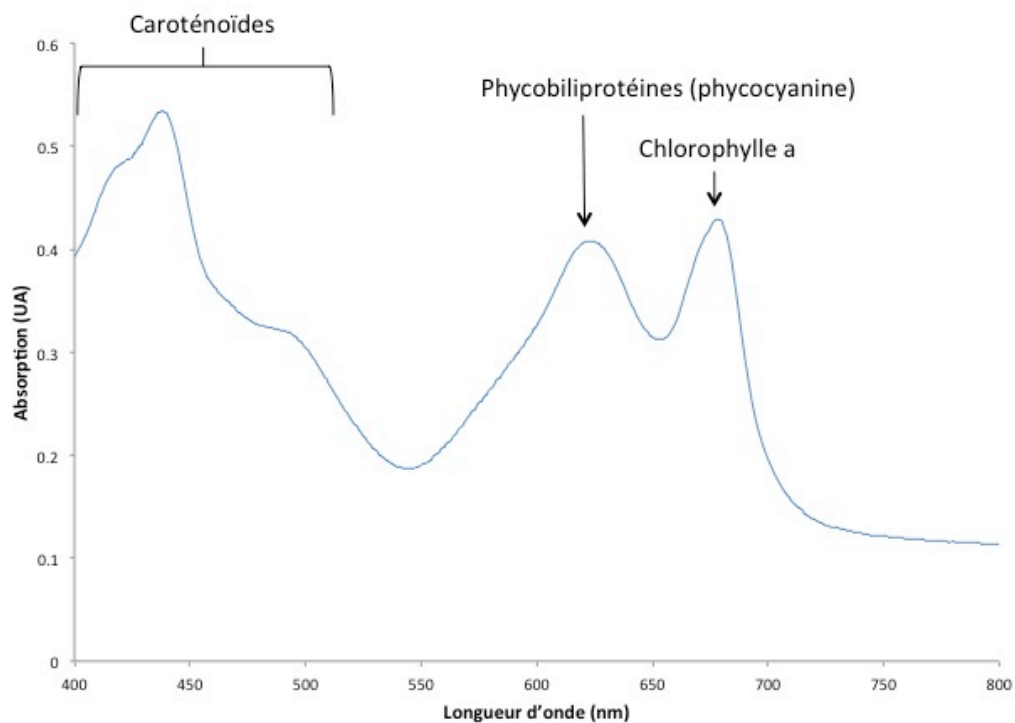


Figure 62 : Absorbance des différents pigments chez *Synechocystis*

Références

Abed RM, Dobretsov S, Sudesh K. 2009. Applications of cyanobacteria in biotechnology. *J Appl Microbiol* **106**:1-12.

Abou Hamdan A, Liebgott PP, Fourmond V, Gutierrez-Sanz O, De Lacey AL, Infossi P, Rousset M, Dementin S, Leger C. 2012. Relation between anaerobic inactivation and oxygen tolerance in a large series of NiFe hydrogenase mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**:19916-19921.

Adams MW. 1990. The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *Biochim Biophys Acta* **1020**:115-145.

Andrews SC, Berks BC, McClay J, Ambler A, Quail MA, Golby P, Guest JR. 1997. A 12-cistron *Escherichia coli* operon (*hyf*) encoding a putative proton-translocating formate hydrogenlyase system. *Microbiology* **143 (Pt 11)**:3633-3647.

Antal TK, Oliveira P, Lindblad P. 2006. The bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *International journal of hydrogen energy*, **31(11)**, 1439-1444.

Antal TK, Lindblad P. 2005. Production of H₂ by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH. *Journal of applied microbiology*, **98(1)**, 114-120.

Appel J, Schulz R. 1996. Sequence analysis of an operon of a NAD(P)-reducing nickel hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 gives additional evidence for direct coupling of the enzyme to NAD(P)H-dehydrogenase (complex I). *Biochim Biophys Acta* **1298**:141-147.

Appel J, Phunpruch S, Steinmüller K, Schulz R. The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis.

Archibald JM. 2009. The puzzle of plastid evolution. *Current Biology*, **19(2)**, **R81-R88**.

Axelsson R, Lindblad P. 2002. Transcriptional regulation of *Nostoc* hydrogenases: effects of oxygen, hydrogen, and nickel. *Applied and environmental microbiology*, **68(1)**, 444-447.

Baebprasert W, Jantaro S, Khetkorn W, Lindblad P, Incharoensakdi A. 2011. Increased H₂ production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by redirecting the electron supply via genetic engineering of the nitrate assimilation pathway. *Metabolic engineering*, **13(5)**, 610-616.

Barz M, Beimgraben C, Staller T, Germer F, Opitz F, Marquardt C, ... Appel J. 2010. Distribution analysis of hydrogenases in surface waters of marine and freshwater environments. *PloS one*, **5(11)**, e13846.

Bhattacharya J, GhoshDastidar K, Chatterjee A, Majee M, Majumder AL. 2004. *Synechocystis* Fe superoxide dismutase gene confers oxidative stress tolerance to *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications*, **316(2)**, 540-544.

Bhaya D. 2004. Light matters: phototaxis and signal transduction in unicellular cyanobacteria. *Molecular microbiology*, **53(3)**, 745-754.

Blokesch M, Paschos A, Bauer A, Reissmann S, Drapal N, Böck A. 2004. Analysis of the transcarbamoylation-dehydration reaction catalyzed by the hydrogenase

maturation proteins HypF and HypE. *European Journal of Biochemistry*, **271**(16), 3428-3436.

Boulay C, Wilson A, D'Haene S, Kirilovsky D. 2010. Identification of a protein required for recovery of full antenna capacity in OCP-related photoprotective mechanism in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**(25), 11620-11625.

Böck A, King PW, Blokesch M, Posewitz MC 2006. Maturation of hydrogenases. *Advances in microbial physiology*, **51**, 1-225.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, **72**(1), 248-254.

Brocks JJ, Logan GA, Buick R, Summons RE. 1999. Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. *Science*, **285**(5430), 1033-1036.

Buhrke T, Lenz O, Krauss N, Friedrich B. 2005. Oxygen tolerance of the H₂-sensing [NiFe] hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 is based on limited access of oxygen to the active site. *Journal of Biological Chemistry*, **280**(25), 23791-23796.

Burgdorf T, Van der Linden E, Bernhard M, Yin, QY, Back JW, Hartog, AF, ... & Friedrich B. 2005. The soluble NAD⁺-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 consists of six subunits and can be specifically activated by NADPH. *Journal of bacteriology*, **187**(9), 3122-3132.

Carrieri D, Ananyev G, Garcia Costas AM, Bryant DA, Dismukes GC. 2008. Renewable hydrogen production by cyanobacteria: nickel requirements for optimal hydrogenase activity. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**(8), 2014-2022.

Carrieri D, Wawrousek K, Eckert C, Yu, J, Maness, PC (2011). The role of the bidirectional hydrogenase in cyanobacteria. *Bioresource technology*, **102**(18), 8368-8377.

Cassier-Chauvat C, Chauvat F. 2002. Cyanobacteria : living fossils for biotechnology, p. 33-44, *Recent Res. Devel. Mol. Microbiol.*

Chee, J. Y., Yoga, S. S., Lau, N. S., Ling, S. C., Abed, R. M., & Sudesh, K. 2010. Bacterially Produced Polyhydroxyalkanoate (PHA): Converting Renewable Resources into Bioplastics. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, **2**, 1395-1404.

Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, **61**(2), 192-208.

Christman, M. F., Storz, G., & Ames, B. N. 1989. OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **86**(10), 3484-3488.

Ciccarelli FD, Doerks T, von Mering C, Creevey CJ, Snel B, Bork P. 2006. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science* **311**:1283-1287.

Costa, M., Costa-Rodrigues, J., Fernandes, M. H., Barros, P., Vasconcelos, V., & Martins, R. 2012. Marine Cyanobacteria Compounds with Anticancer Properties: A Review on the Implication of Apoptosis. *Marine drugs*, **10**(10), 2181-2207.

Cournac, L., Mus, F., Bernard, L., Guedeney, G., Vignais, P., & Peltier, G. 2002. Limiting steps of hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Synechocystis* PCC 6803 as analysed by light-induced gas exchange transients. *International Journal of Hydrogen Energy*, **27**(11), 1229-1237.

Cournac L, Guedeney G, Peltier G, Vignais PM. 2004. Sustained photoevolution of molecular hydrogen in a mutant of *Synechocystis* sp strain PCC 6803 deficient in the type I NADPH-dehydrogenase complex. *Journal of Bacteriology* **186**:1737-1746.

Davies, M. J. 2003. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and biophysical research communications*, 305(3), 761-770.

Dietrich, W. E., & Perron, J. T. 2006. The search for a topographic signature of life. *Nature*, 439(7075), 411-418.

Dixit, R. B., & Suseela, M. R. 2013. Cyanobacteria: potential candidates for drug discovery. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1-15.

Ducat, D. C., Way, J. C., & Silver, P. A. 2011. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends in biotechnology*, 29(2), 95-103.

Duché, O., Elsen, S., Cournac, L., & Colbeau, A. 2005. Enlarging the gas access channel to the active site renders the regulatory hydrogenase HupUV of *Rhodobacter capsulatus* O₂ sensitive without affecting its transducing activity. *FEBS Journal*, 272(15), 3899-3908.

Dutheil J, Saenkham P, Sakr S, Leplat C, Ortega-Ramos M, Bottin H, Cournac L, Cassier-Chauvat C, Chauvat F. 2012. The AbrB2 Autorepressor, Expressed from an Atypical Promoter, Represses the Hydrogenase Operon To Regulate Hydrogen Production in *Synechocystis* Strain PCC6803. *Journal of Bacteriology* **194**:5423-5433.

Eckert, C., Boehm, M., Carrieri, D., Yu, J., Dubini, A., Nixon, P. J., & Maness, P. C. 2012. Genetic Analysis of the Hox Hydrogenase in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 Reveals Subunit Roles in Association, Assembly, Maturation, and Function. *Journal of Biological Chemistry*, 287(52), 43502-43515.

Edge, R., McGarvey, D. J., & Truscott, T. G. 1997. The carotenoids as antioxidants—a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 41(3), 189-200.

Eroglu, E., & Melis, A. 2011. Photobiological hydrogen production: recent advances and state of the art. *Bioresource technology*, 102(18), 8403-8413.

Fridovich, I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science*, 201(4359), 875-880.

Fridovich, I. 1997. Superoxide Anion Radical (O₂⁻), Superoxide Dismutases, and Related Matters. *Journal of Biological Chemistry*, 272(30), 18515-18517.

Gaillard, F., Scaillet, B., & Arndt, N. T. 2011. Atmospheric oxygenation caused by a change in volcanic degassing pressure. *Nature*, 478(7368), 229-232.

Gaffron, H., & Rubin, J. 1942. Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *The journal of general physiology*, 26(2), 219-240.

Germer, F., Zebger, I., Saggi, M., Lendzian, F., Schulz, R., & Appel, J. 2009. Overexpression, isolation, and spectroscopic characterization of the bidirectional [NiFe] hydrogenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Biological Chemistry*, 284(52), 36462-36472.

Gest, H., & Kamen, M. D. 1949. STUDIES ON THE METABOLISM OF PHOTOSYNTHETIC BACTERIA IV.: Photochemical Production of Molecular Hydrogen by Growing Cultures of Photosynthetic Bacteria. *Journal of bacteriology*, 58(2), 239.

Ghirardi, M. L., Dubini, A., Yu, J., & Maness, P. C. 2009. Photobiological hydrogen-producing systems. *Chemical Society Reviews*, 38(1), 52-61.

Gilbert, H.F. 1990 Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **63**: 69-172.

Glazer, A. N. 1984. Phycobilisome A macromolecular complex optimized for light energy transfer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Bioenergetics*, 768(1), 29-51.

Grigorieva, G., & Shestakov, S. 1982. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiology Letters*, 13(4), 367-370.

Gutekunst K, Phunpruch S, Schwarz C, Schuchardt S, Schulz-Friedrich R, Appel J. 2005. LexA regulates the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803 as a transcription activator. *Molecular Microbiology* **58**:810-823.

Gutekunst, K., Hoffmann, D., Lommer, M., Egert, M., Suzuki, I., Schulz-Friedrich, R., & Appel, J. 2006. Metal dependence and intracellular regulation of the bidirectional NiFe-hydrogenase in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *International journal of hydrogen energy*, 31(11), 1452-1459.

Gutthann, F., Egert, M., Marques, A., & Appel, J. 2007. Inhibition of respiration and nitrate assimilation enhances photohydrogen evolution under low oxygen concentrations in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767(2), 161-169.

Havaux, M., Guedeney, G., Hagemann, M., Yeremenko, N., Matthijs, H. C., & Jeanjean, R. 2005. The chlorophyll-binding protein IsiA is inducible by high light and protects the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 from photooxidative stress. *FEBS letters*, 579(11), 2289-2293.

He, Q., Dolganov, N., Björkman, O., & Grossman, A. R. 2001. The High Light-inducible Polypeptides in *Synechocystis* PCC6803 EXPRESSION AND FUNCTION IN HIGH LIGHT. *Journal of Biological Chemistry*, 276(1), 306-314.

Hoffmann D, Gutekunst K, Klissenbauer M, Schulz-Friedrich R, Appel J. 2006. Mutagenesis of hydrogenase accessory genes of *Synechocystis* sp PCC 6803 - Additional homologues of *hypA* and *hypB* are not active in hydrogenase maturation. *Febs Journal* **273**:4516-4527.

Horner, D. S., Heil, B., Happe, T., & Embley, T. M. 2002. Iron hydrogenases—ancient enzymes in modern eukaryotes. *Trends in biochemical sciences*, 27(3), 148-153.

HOPPE-SEYLER, F. 1887 Die Methangährung der Essigsäure. *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 11, 561-568.

Houot L, Floutier M, Marteyn B, Michaut M, Picciocchi A, Legrain P, Aude JC, Cassier-Chauvat C, Chauvat F. 2007. Cadmium triggers an integrated reprogramming of the metabolism of *Synechocystis* PCC6803, under the control of the *Slr1738* regulator. *Bmc Genomics* **8**.

Ihalainen, J. A., D'Haene, S., Yeremenko, N., van Roon, H., Arteni, A. A., Boekema, E. J., ... & Dekker, J. P. 2005. Aggregates of the chlorophyll-binding protein IsiA (CP43') dissipate energy in cyanobacteria. *Biochemistry*, 44(32), 10846-10853.

Imlay, J. A., & Fridovich, I. 1991. Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 266(11), 6957-6965.

Imlay, J. A. 2003. Pathways of oxidative damage. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 395-418.

Imlay JA. 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide, p. 755-776, *Annual Review of Biochemistry*, vol. 77. Annual Reviews, Palo Alto.

Jakopitsch, C., Auer, M., Regelsberger, G., Jantschko, W., Furtmüller, P. G., Rüker, F., & Obinger, C. 2003. Distal site aspartate is essential in the catalase activity of catalase-peroxidases. *Biochemistry*, 42(18), 5292-5300.

Jittawuttipoka, T., Planchon, M., Spalla, O., Benzerara, K., Guyot, F., Cassier-Chauvat, C., & Chauvat, F. 2013. Multidisciplinary Evidences that *Synechocystis* PCC6803 Exopolysaccharides Operate in Cell Sedimentation and Protection against Salt and Metal Stresses. *PloS one*, 8(2), e55564.

Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirose M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, Tabata S. 1996. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 3:109-136.

Kim, D. H. & Kim, M. S. 2011. Hydrogenases for biological hydrogen production. *Bioresour Technol*, 102,8423-31.

Kirilovsky, D., & Kerfeld, C. A. 2012. The orange carotenoid protein in photoprotection of photosystem II in cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(1), 158-166.

Kiss E, Kos PB, Vass I. 2009. Transcriptional regulation of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Journal of Biotechnology* 142:31-37.

Kleihues L, Lenz O, Bernhard M, Buhrke T, Friedrich B. 2000. The H(2) sensor of *Ralstonia eutropha* is a member of the subclass of regulatory [NiFe] hydrogenases. *J Bacteriol* 182:2716-2724.

Kucho, K. I., Okamoto, K., Tsuchiya, Y., Nomura, S., Nango, M., Kanehisa, M., & Ishiura, M. 2005. Global analysis of circadian expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of bacteriology*, 187(6), 2190-2199.

Labarre J, Chauvat F, Thuriaux P. 1989. INSERTIONAL MUTAGENESIS BY RANDOM CLONING OF ANTIBIOTIC-RESISTANCE GENES INTO THE GENOME OF THE CYANOBACTERIUM *SYNECHOCYSTIS* STRAIN PCC-6803. *Journal of Bacteriology* 171:3449-3457.

Latifi, A., Ruiz, M., & Zhang, C. C. 2009. Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS microbiology reviews*, 33(2), 258-278.

Larsson J, Nylander JAA, Bergman B. 2011. Genome fluctuations in cyanobacteria reflect evolutionary, developmental and adaptive traits. *Bmc Evolutionary Biology* 11:21.

Leplat, C., Champeimont, R., Saenkham, P., Cassier-Chauvat, C., Jean-Christophe, A., & Chauvat, F. 2012. Genome-wide transcriptome analysis of hydrogen production in the cyanobacterium *Synechocystis*: Towards the identification of new players. *International Journal of Hydrogen Energy*.

Levine, R. L., Berlett, B. S., Moskovitz, J., Mosoni, L., & Stadtman, E. R. 1999. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mechanisms of ageing and development*, 107(3), 323-332.

Li, H., Singh, A. K., McIntyre, L. M., & Sherman, L. A. 2004. Differential gene expression in response to hydrogen peroxide and the putative PerR regulon of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of bacteriology*, 186(11), 3331-3345.

Liu, L. N., Chen, X. L., Zhang, Y. Z., & Zhou, B. C. 2005. Characterization, structure and function of linker polypeptides in phycobilisomes of cyanobacteria and red algae: an overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1708(2), 133-142.

Mazouni, K., Domain, F., Chauvat, F., & Cassier-Chauvat, C. 2003. Expression and regulation of the crucial plant-like ferredoxin of cyanobacteria. *Molecular microbiology*, 49(4), 1019-1029.

Maeda, H., Sakuragi, Y., Bryant, D. A., & DellaPenna, D. 2005. Tocopherols protect *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 from lipid peroxidation. *Plant physiology*, 138(3), 1422-1435.

Maeda, T., et al., 2008. Metabolic engineering to enhance bacterial hydrogen production. *Microb Biotechnol.* 1, 30-9.

Manyani, H., Rey, L., Palacios, J. M., Imperial, J., & Ruiz-Argüeso, T. 2005. Gene products of the hupGHIJ operon are involved in maturation of the iron-sulfur subunit of the [NiFe] hydrogenase from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Journal of bacteriology*, 187(20), 7018-7026.

Marraccini P, Bulteau S, Cassierchauvat C, Mermetbouvier P, Chauvat F. 1993. A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of the genera *Synechococcus* and *Synechocystis*. *Plant Molecular Biology* 23:905-909.

Masip, L., Veeravalli, K., & Georgiou, G. 2006. The many faces of glutathione in bacteria. *Antioxidants & redox signaling*, 8(5-6), 753-762.

McGlynn, S. E., Mulder, D. W., Shepard, E. M., Broderick, J. B., & Peters, J. W. 2009. Hydrogenase cluster biosynthesis: organometallic chemistry nature's way. *Dalton Transactions*, (22), 4274-4285.

McKinlay, J. B., & Harwood, C. S. 2010. Photobiological production of hydrogen gas as a biofuel. *Current opinion in biotechnology*, 21(3), 244-251.

McNeely, K., Xu, Y., Bennette, N., Bryant, D. A., & Dismukes, G. C. 2010. Redirecting reductant flux into hydrogen production via metabolic engineering of fermentative carbon metabolism in a cyanobacterium. *Applied and environmental microbiology*, 76(15), 5032-5038.

Mejean, A., & Ploux, O. 2013. A Genomic View of Secondary Metabolite Production in Cyanobacteria. *GENOMICS OF CYANOBACTERIA*, 65, 189-234.

Mermetbouvier P, Chauvat F. 1994. A conditional expression vector for the cyanobacteria *Synechocystis* sp strains pcc6803 and pcc6714 or *Synechococcus* sp strains pcc7942 and pcc6301. *Current Microbiology* 28:145-148.

Meyer, J., Kelley, B. C., & Vignais, P. M. 1978. Effect of light nitrogenase function and synthesis in *Rhodospseudomonas capsulata*. *Journal of bacteriology*, 136(1), 201-208.

Mimuro, M., & Katoh, T. 1991. Carotenoids in photosynthesis: absorption, transfer and dissipation of light energy. *Pure and Applied Chemistry*, 63(1), 123-130.

Mitschke, J., Georg, J., Scholz, I., Sharma, C. M., Dienst, D., Bantscheff, J., ... & Hess, W. R. 2011. An experimentally anchored map of transcriptional start sites in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(5), 2124-2129.

Narainsamy K, Marteyn B, Sakr S, Cassier-Chauvat C, Chauvat F. 2013. Chapter Five - Genomics of the Pleiotropic Glutathione System in Cyanobacteria, p. 157-188, vol. 65. Academic Press, *Advances in Botanical Research*.

Nicolet Y, Piras C, Legrand P, Hatchikian CE, Fontecilla-Camps JC. 1999. *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Structure with Folding & Design* 7:13-23.

Nishida, M., Maruyama, Y., Tanaka, R., Kontani, K., Nagao, T., & Kurose, H. 2000. Gai and Gao are target proteins of reactive oxygen species. *Nature*, 408(6811), 492-495.

Nishiyama, Y., Yamamoto, H., Allakhverdiev, S. I., Inaba, M., Yokota, A., & Murata, N. 2001. Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. *The EMBO journal*, 20(20), 5587-5594.

Nunnery, J. K., Mevers, E., & Gerwick, W. H. 2010. Biologically active secondary metabolites from marine cyanobacteria. *Current opinion in biotechnology*, 21(6), 787-793.

Olive, J., Ajlani, G., Astier, C., Recouvreur, M., & Vernotte, C. 1997. Ultrastructure and light adaptation of phycobilisome mutants of *Synechocystis* PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1319(2), 275-282.

Oliveira P, Lindblad P. 2005. LexA, a transcription regulator binding in the promoter region of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803. *Fems Microbiology Letters* **251**:59-66.

Oliveira P, Lindblad P. 2008. An AbrB-like protein regulates the expression of the bidirectional hydrogenase in *Synechocystis* sp strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology* **190**:1011-1019.

Oliveira P, Lindblad P. 2009. Transcriptional regulation of the cyanobacterial bidirectional Hox-hydrogenase. *Dalton Transactions*:9990-9996.

Pandu, K., & Joseph, S. 2012. Comparisons and limitations of biohydrogen production processes: a review. *Int J Adv Eng Technol*, 2, 342-356.

Partensky, F., Blanchot, J., & Vaulot, D. 1999. Differential distribution and ecology of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in oceanic waters: a review. *Bulletin-institut oceanographique monaco-numero special-*, 457-476.

Pereira, S., Zille, A., Micheletti, E., Moradas-Ferreira, P., De Philippis, R., & Tamagnini, P. 2009. Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS microbiology reviews*, 33(5), 917-941.

Peters JW, Lanzilotta WN, Lemon BJ, Seefeldt LC. 1998. X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science* **282**:1853-1858.

Posewitz, M. C., King, P. W., Smolinski, S. L., Zhang, L., Seibert, M., & Ghirardi, M. L. 2004. Discovery of two novel radical S-adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25711-25720.

Powel, B., Mergeay, M., and Christofi, N. 1989. Transfer of broad-host-range plasmids to sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **59**: 269-274.

Raven, J. A., Evans, M. C., & Korb, R. E. 1999. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. *Photosynthesis Research*, 60(2-3), 111-150.

Richardson, D. L., Reed, R. H., & Stewart, W. D. P. 1983. *Synechocystis* PCC6803: a euryhaline cyanobacterium. *FEMS Microbiology Letters*, 18(1-2), 99-102.

Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY. 1979. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* **111**:1-61.

Rosgaard, L., de Porcellinis, A. J., Jacobsen, J. H., Frigaard, N. U., & Sakuragi, Y. 2012. Bioengineering of carbon fixation, biofuels, and biochemicals in cyanobacteria and plants. *Journal of Biotechnology*, 162(1), 134-147.

Russo, P., & Cesario, A. 2012. New Anticancer Drugs from Marine Cyanobacteria. *Current Drug Targets*, 13(8), 1048-1053.

Sakr S, Dutheil J, Saenkham P, Bottin H, Leplat C, Ortega-Ramos M, Aude J-C, Chapuis V, Guedeney G, Decottignies P, Lemaire S, Cassier-Chauvat C, Chauvat F. (2013). The activity of the *Synechocystis* PCC6803 AbrB2 regulator of hydrogen production can be post-translationally controlled through glutathionylation. *international journal of hydrogen energy*, 38(31), 13547-13555.

Schmitz O, Boison G, Hilscher R, Hundeshagen B, Zimmer W, Lottspeich F, Bothe H. 1995. Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria. *Eur J Biochem* **233**:266-276.

Schneider, K., & Schlegel, H. G. 1976. Purification and properties of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H 16. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 452(1), 66-80.

Schütz, K., Happe, T., Troshina, O., Lindblad, P., Leitão, E., Oliveira, P., & Tamagnini, P. 2004. Cyanobacterial H₂ production—a comparative analysis. *Planta*, 218(3), 350-359.

Shih, P. M., Wu, D., Latifi, A., Axen, S. D., Fewer, D. P., Talla, E., ... & Kerfeld, C. A. 2013. Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(3), 1053-1058.

Shima, S., & Thauer, R. K. 2007. A third type of hydrogenase catalyzing H₂ activation. *The Chemical Record*, 7(1), 37-46.

Sies, H. 1994. Strategies of antioxidant defense. In *EJB Reviews 1993* (pp. 101-107). Springer Berlin Heidelberg.

Stanier RY, Cohen-Bazire G. 1977. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu Rev Microbiol* 31:225-274.

Stephenson, M., & Stickland, L. H. 1931. Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen: The properties of the enzyme. *Biochemical Journal*, 25(1), 205.

Storz, G., & Imlay, J. A. 1999. Oxidative stress. *Current opinion in microbiology*, 2(2), 188-194.

Summerfield, T. C., & Sherman, L. A. 2008. Global transcriptional response of the alkali-tolerant cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 to a pH 10 environment. *Applied and environmental microbiology*, 74(17), 5276-5284.

Sybirna, K., & Bottin, H. 2013. New insights into the systems for heterologous synthesis and maturation of hydrogenases, the most efficient biohydrogen producers. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(30), 13164-13171.

Szabó, I., Bergantino, E., & Giacometti, G. M. 2005. Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation. *EMBO reports*, 6(7), 629-634.

Tamagnini P, Leitaó E, Oliveira P, Ferreira D, Pinto F, Harris DJ, Heidorn T, Lindblad P. 2007. Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications. *Fems Microbiology Reviews* 31:692-720.

Troshina, O., Serebryakova, L., Sheremetieva, M., & Lindblad, P. 2002. Production of H₂ by the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 during fermentation. *International journal of hydrogen energy*, 27(11), 1283-1289.

Tsang, T. K., Roberson, R. W., & Vermaas, W. F. 2013. Polyhydroxybutyrate particles in *Synechocystis* sp. PCC 6803: facts and fiction. *Photosynthesis research*, 118(1-2), 37-49.

Vignais PM, Billoud B, Meyer J. 2001. Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol Rev* 25:455-501.

Vignais PM, Colbeau A. 2004. Molecular biology of microbial hydrogenases. *Current Issues in Molecular Biology* 6:159-188.

Volbeda, A., Charon, M. H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M., & Fontecilla-Camps, J. C. 1995. Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*.

Wall, J. D. 2004. Rain or shine—a phototroph that delivers. *Nature biotechnology*, 22(1), 40-41.

Wilson, A., Ajlani, G., Verbavatz, J. M., Vass, I., Kerfeld, C. A., & Kirilovsky, D. 2006. A soluble carotenoid protein involved in phycobilisome-related energy dissipation in cyanobacteria. *The Plant Cell Online*, 18(4), 992-1007.

Wright, J. A., Turrell, P. J., & Pickett, C. J. 2010. The Third Hydrogenase: More Natural Organometallics. *Organometallics*, 29(23), 6146-6156.

Yamauchi Y, Kaniya Y, Kaneko Y, Hihara Y. 2011. Physiological Roles of the cyAbrB Transcriptional Regulator Pair Sll0822 and Sll0359 in *Synechocystis* sp strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology* **193**:3702-3709.

Yang, X.J., Fane, A.G., and MacNaughton, S. 2001. Removal and recovery of heavy metals from wastewaters by supported liquid membranes. *Water Sci Technol* **43**: 341-348.

Annexe

ANNEXE 1

MILIEU DE CULTURE

Composé	Concentrations finales (nM)
NaNO ₃	17,65
K ₂ HPO ₄	0,18
MgSO ₄	0,30
CaCl ₂	0,25
Na ₂ CO ₃	3,78
Di-sodium-magnésium EDTA	0,003
Acide citrique (C ₆ H ₈ O ₇)	0,029
Citrate d'ammonium ferrique Fe(NH ₄)C ₆ H ₅ O ₇	0,016

Tableau 6 : Composition du milieu de culture MM (BG11 modifié)

Composé traces	Concentrations finales (μM)
H ₃ BO ₃	46
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,17
CuSO ₄	0,32
MnCl ₂	9,2
Na ₂ Mo ₂ O ₇ ·2H ₂ O	1,6
ZnSO ₄	0,77

Tableau 7 : Composition finale en éléments traces du milieu de culture MM (BG11 modifié)

ANNEXE 2

PREPARATION DES CELLULES COMPETENTES :

- Faire une culture de nuit de la souche à transformer dans 5 ml de milieu LB
- ensemencer 100 ml de milieu LB + 10 mM de MgSO₄ au 1/100.
- Faire pousser jusqu'à DO₅₄₀ = 0,4.
- Mettre la culture à 0°C pendant 5 minutes.
- Centrifuger la culture 5 minutes à 5 000g à 4°C.
- Reprendre les cellules dans 1/5 du volume (20 ml) de RF1.
- Laisser 20 minutes dans la glace.
- Centrifuger 5 minutes à 5 000g à 4°C.
- Reprendre les cellules dans 1/25 du volume (4 ml) de RF2.
- Laisser 5 minutes dans la glace.
- Ajouter l'ADN à 100 μl de cellules (en eppendorf).
- Laisser 30 minutes dans la glace.

ANNEXE 3 : Table S2. Oligonucleotide primers used in this study

Table 2S

Name	Sequence 5'→3'	Purpose
Construction and PCR verification of the pFCIK		
KmHinCFW	GGCGCTGAG GTGAC CTC GTGAAGAAG	Fwd primer to amplify the Km ^r gene of pUC4K with a <i>HincII</i> site
KmHinCRV	ACCTGCAGGGG GTGAC GGAA AGCCAC	Rev primer for the same purpose
Construction and PCR verification of the Δhox::Km^r mutant		
Hoxup2Fwd	TCAATGTACAGGATCCCACCAA CAATG	Fwd primer to amplify the <i>hox-operon</i> UR starting 422 bp upstream of the <i>hoxE</i> start codon
Hoxup2SphIRv	CCAGGTAAATTT GCATGC GAAA GTTAGCC	Rev primer to amplify the <i>hox-operon</i> UR (starting 58 bp upstream of the <i>hoxE</i> start codon) and introduce a <i>SphI</i> site
HoxdownAflIFwd	CATTCAGACG CTTAAG AAAATA CCCCGGC	Fwd primer to amplify the <i>hox-operon</i> DR (starting 8 bp downstream of the <i>hoxH</i> stop codon) and introduce a <i>AflI</i> site
HoxDwnRvBis	ACCGGACGTCAAGTCTCGTTG ACAAAA	Rev to amplify the <i>hox-operon</i> DR starting 206 bp downstream the <i>hoxH</i> stop codon
pFCIKmSphIfwd	TCACTGATCC GCATGC CCGTT CCATA	Fwd primer to amplify the Km ^r cassette from pFCIK with a <i>SphI</i> site
pFCIKmAflIRv	GTGGGCGGGTT CTTAAG AATT AGTGGTG	Rev primer to amplify the Km ^r cassette from pFCIK with <i>AflI</i> site
HoxDwnRvBis	ACCGGACGTCAAGTCTCGTTG ACAAAA	Rev primer to amplify the <i>hox-operon</i> DR (starting 206 bp downstream of the <i>hoxH</i> stop codon) and check chromosome segregation
pR2Fwd	ATTGTGGGCAAGATTGTGGAG G	Fwd primer inside the <i>hox</i> promoter region (starting 206 bp upstream of the <i>hoxE</i> start codon) to check chromosome segregation
HoxERv	GCCAATACCGCTTCGTCATTCT	Rev primer inside of the <i>hoxE</i> CS to check chromosome segregation
HoxHFwd	GGATTGTGGACCGTTTACCA	Foward primer inside the <i>hoxH</i> CS to check chromosome segregation
pFCIKmRv	ATCCTCGGTTTTCTGGAAGGC	Rev primer to check the orientation of the Km ^r cassette, and chromosome segregation
pFCIKmStuIFwd	GCGATT CAGGCCT GGTATGAG TCAGC	Rev primer of the Km ^r cassette harboring a <i>StuI</i> site, used to check Km ^r orientation and chromosome segregation
Construction of the pTR-hox and pCE-hox		
HoxupBamHIFwd	GGCATTGATAAT GGATCC CT CGTAGGTCTAA	Fwd primer to amplify the <i>hox-promoter</i> UR (starting 956 bp upstream of the <i>hoxE</i> start codon) with a <i>BamHI</i> site
HoxupSphIRv	TCTGGGTGTTGTT GCATGC T GATTTCTAGG	Rev primer to amplify the <i>hox-promoter</i> UR (starting 707 bp upstream of the <i>hoxE</i> start codon) and introduce a <i>SphI</i> site

HoxENdelFwd	TTTGAGGATTTT CATATG ACC GTTGCCACC	Fwd primer to amplify the <i>hox-promoter</i> DR (starting 15 bp upstream of the <i>hoxE</i> start codon) and introduce a <i>NdeI</i> site
HoxEEcoRIRv	TCACCTGATACT GAATTC CCG TTAACTGTT	Rev primer to amplify the <i>hox-promoter</i> DR (starting 9 bp before the <i>hoxE</i> stop coon) and introduce a <i>EcoRI</i> site

PCR verification of chromosome segregation in TR1 and CE1 mutants

HoxupBamHIFwd	GGCATTGATAAT GGATCC CT CGTAGGTCTAA	Fwd primer to amplify the <i>hox-promoter</i> UR (starting 957 bp upstream of the <i>hoxE</i> start codon) with a <i>BamHI</i> site, and check chromosome segregation
phoxFw1	GGCGACGTGCGTCCTCAAGC	Fwd primer to check chromosome segregation
HoxERv	GCCAATACCGCTTCGTCATTC T	Rev primer to check chromosome segregation
pFCIKmRv	ATCCTCGGTTTTCTGGAAGG C	Rev primer inside the Km ^r cassette to check its orientation, and chromosome segregation
pFCIAIFwd	GGCGACGTGCGTCCTCAAGC	Fwd primer to check chromosome segregation
pR1Rv	CGAAGAAAGGAGGGTAAGTC GAAGTAGTTAC	Rev primer (starting 672 bp upstream of the <i>hoxE</i> start codon) to check chromosome segregation
pR2Fwd	ATTGTGGGCAAGATTGTGGA GG	Fwd primer (starting 206 bp upstream of the <i>hoxE</i> start codon) to check chromosome segregation

Construction and PCR verification of the pTR

HypA1NdeIFwd	CCCAGAGTTAAT CATATG CAC GAAGTTAGTCTG	Fwd primer to amplify <i>hypA1</i> (starting 15 bp upstream of its start codon) with a <i>NdeI</i> site
HypA1ASSRv	TTAATGTTATGACCCATGCTC AACTCAGTTC	Rev primer to amplify <i>hypA1</i> (starting 15 bp upstream its stop codon) for PCR assembly with with <i>hypB1</i>
HypB1ASSFwd	GGTCATAACATTAATATTTCC GCCCG AGGAGG	Fwd primer to amplify <i>hypB1</i> (starting 41 bp upstream of its start codon) along with <i>hypA1</i> downstream region by PCR assembly
HypB1SalIRv	GTCAGTCC GTGAC TTTTTC CTTCAACTC	Rev primer to amplify <i>hypB1</i> (starting downstream of its stop codon) with a <i>SalI</i> site
HypCSalIFwdbis	CTGACTTA GTGAC AAATTCCT CC AGGAGG TCCTCCCATGTG TC	Fwd primer to amplify <i>hypC</i> (starting 36 bp upstream of its start codon) with a <i>SalI</i> site and a SD
HypCASSrvbis	CCAAGGTTAACGCTCTATTCT TAAGTCTAGGAAT TAA ACTCC C	Rev primer for PCR assembly amplification of <i>hypC</i> (starting 10 bp before its stop codon) along with <i>hypD</i> UR
HypDASSfwd	GAGCGTTAACCTTGGAATCA GTT AGGAGG GTTT	Fwd primer for PCR assembly amplification of <i>hypD</i> (starting 38 bp upstream of its start codon) along with the <i>hypC</i> DR
HypDASSRv	TGCAGGATGTAATTGTCTGAT CCCAGCAAAC	Rev primer for PCR assembly amplification of <i>hypD</i> (starting 1 bp before <i>hypC</i> stop codon) along with the <i>hypE</i> UR
HypEASSFwd	GAATTACATCCTGCAACAAAG AGGAGG GCTG	Fwd primer for PCR assembly amplification of <i>hypE</i> (starting 34 bp upstream of its start codon) along with the <i>hypD</i> DR
HypEBspelRv	CAGTCTAGGGCT TCGG AAT GGAGTCCTAAC	Rev primer to amplify <i>hypE</i> (starting 5 bp before its stop codon) with a <i>BspEI</i> site
HypFBspelFwd bis	CAT TCGG ATATTTAACAGT ATTAA AGGAGG TAGAATAATG	Fwd primer to amplify <i>hypF</i> (starting 39 bp upstream of its start codon) with a <i>BspEI</i> site

HypFBspeIRv	TTTGGTTAT TCGGGA GTTGAGT TAACAGATATATTGCCG	Rev primer to amplify <i>hypF</i> (starting 18 bp before its stop codon) with a <i>BspeI</i> site
HypELeft	GCCTGTGAACTGTTGGGTTT	Fwd primer of <i>hypE</i> to verify <i>hypF</i> orientation
HypFRight	AGTCGGTACATTGGCGAAAC	Rev primer of <i>hypE</i> to verify <i>hypF</i> orientation

RT qPCR analysis

HoxE Left	GCCCATCCTAGTGGAGACAA	<i>hoxE</i> Fwd primer starting 42 bp upstream of its ATG start codon
HoxE Right	GGTAAAAAGTCGCCACTCCA	<i>hoxE</i> Rev primer starting 301 bp upstream of its stop codon
HoxF Left	TGAAATGACCCCAGAGGAAG	<i>hoxF</i> Fwd primer starting 478 bp downstream of its ATG start codon
HoxF Right	ATACCTTCGAGGATGCGATG	<i>hoxF</i> Rev primer starting 948 bp upstream of its stop codon
sll1222 Left	TGCTATGGCTATCCCCTCTG	<i>sll1222</i> Fwd primer starting 325 bp downstream of its ATG start codon
sll122 Right	AGCTCCCTTGGTTTTCCATT	<i>sll1222</i> Rev primer starting 145 bp upstream of its stop codon
HoxU Left	GTTTGTGCATGGTGAAGTG	<i>hoxU</i> Fwd primer starting 142 bp downstream of its start codon
HoxU Right	ATTCACAGTTGCCGTTAGCC	<i>hoxU</i> Rev primer starting 406 bp downstream of its stop codon
HoxY Left	CTCAAGGAATACCCGGACAA	<i>hoxY</i> Fwd primer starting 155 bp downstream of its start codon
HoxY Right	AGAACCGGATCGCTACCTTT	<i>hoxY</i> Rev primer starting 249 bp upstream of its stop codon
ssl2420 Left	CCCCAGAGGAGCAAAAGTTA	<i>ssl2420</i> Fwd primer starting 45 bp downstream of its start codon
ssl2420 Right	TCTTGGGTTCTTTCCTCACG	<i>ssl2420</i> Rev primer starting 48 bp upstream of its stop codon
sll1225 Left	TGTCCGACTTCTTGTTGGGTA	<i>sll1225</i> Fwd primer starting 68 bp downstream of its start codon
sll1225 Right	AGCAATTTGGGCTTGAGTGT	<i>sll1225</i> Rev primer starting 248 bp upstream of its stop codon
HoxH Left	CTGCGCCGTTTAATGAATTT	<i>hoxH</i> Fwd primer starting 293 bp downstream of its start codon
HoxH Right	CACTGACCAAGCAGAGTGGA	<i>hoxH</i> Rev primer starting 938 bp upstream of the <i>hoxY</i> stop codon
HypA1 Left	TACGGTTTGCGTTTGAAGTG	<i>hypA1</i> Fwd primer starting 130 bp downstream of its start codon
HypA1 Right	GTTCCAACGTGTTTGCCATCC	<i>hypA1</i> Rev primer starting 43 bp upstream of the <i>hypB1</i> stop codon
HypB1 Left	GGGCTATTTCCAGGCTAAGG	<i>hypB1</i> Fwd primer starting 239 bp downstream of its start codon
HypB1 Right	GAGACGTTGGGCATCGTTAT	<i>hypB1</i> Rev primer starting 476 bp upstream of its stop codon
HypC Left	CTCCGATCCCCTGTTACTGA	<i>hypC</i> Fwd primer starting 44 bp downstream of its start codon

HypC Right	CTCCCATTCTGCCAAGTCT	<i>hypC</i> Rev primer starting 25 bp upstream of its stop codon
HypD Left	GGGAAAGGCCTATCAACAT	<i>hypD</i> Fwd primer starting 618 bp downstream of its start codon
HypD Right	TCGACTGGCTCAAACACTTG	<i>hypD</i> Rev primer starting 333 bp upstream of its stop codon
HypE Left	GCCTGTGAACTGTTGGGTTT	<i>hypE</i> Fwd primer starting 809 bp downstream of its start codon
HypE Right	CCCAAGGTTTGTGCACTTTT	<i>hypE</i> Rev primer starting 102 bp upstream of the <i>hypD</i> stop codon
HypF Left	TCCGCCTGCTTAACAGAACT	<i>hypF</i> Fwd primer starting 341 bp downstream of its start codon
HypF Right	AGTCGGTACATTGGCGAAAC	<i>hypF</i> Rev primer starting 1846 bp upstream of its stop codon

Abstract

Photosynthetic organisms are attractive organisms for hydrogen production using water and solar energy, while preserving fresh water and arable soils without adding fertilizers.

The model cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 produces small and transitory amounts of H₂ thanks to its bidirectional [NiFe] hydrogenase Hox. The Hox complex with its 5 protein subunits (HoxEFUYH) catalyzes the reversible reaction $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$. The [NiFe] catalytic site of the Hox enzyme is assembled using a six-subunits HypABCDEF complex and matured by the HoxW protease that cleaves HoxH and activates its [NiFe]-containing center.

Engineering cyanobacteria for hydrogen production relies on a better understanding of the role of hydrogenase in the cyanobacterium metabolism. During my PhD, I have constructed and analyzed 7 sophisticated mutants of *Synechocystis*, allowing the simultaneous over-expression (constitutive or regulated by the growth temperature) of the *hoxEFUYH* and *hypABCDEF* genes. We demonstrated that the simultaneous over-production of the HoxEFUYH and HypABCDEF proteins, combined to an increase in nickel availability led to an approximately 20-fold increase of the active hydrogenase level. Moreover, using a deleted *hox*-operon mutant we showed that hydrogenase is dispensable in standard phototrophic growth conditions. Comparing the phenotypes of different mutants constructed in this study enables us to demonstrate for the first time that the hydrogenase operates in cell protection against oxidative stress (H₂O₂) and sugar stress (glucose or glycerol). Besides, I have also participated to the characterization of a new regulator (AbrB2) of the expression of the hydrogenase. This transcription factor represses the *hoxEFUYH* operon and is involved in the tolerance to stress induced by diamide or nickel. For the first time in cyanobacteria, a redox control of the activity of this regulator by a post-translational glutathionylation was identified.

Collectively, our findings showed that several genetic and physiological strategies should be combined in a single strain to strongly increase hydrogen production in *Synechocystis*. Meanwhile the presently constructed mutants proved to be very powerful tools to achieve this goal.

Key words : Cyanobacteria, *Synechocystis* PCC 6803, Hydrogen, Hydrogenase, Photoproduction, Regulation, Assembly and Maturation of the hydrogenase, AbrB, Biofuels, Bioenergy, Glutathionylation, Oxidative stress, Sugar stress

Résumé

Les microorganismes photosynthétiques suscitent un intérêt biotechnologique grandissant pour la production de dihydrogène (H₂) à partir d'eau et d'énergie solaire en préservant l'eau douce et les terres cultivables sans ajout d'engrais. La cyanobactérie modèle *Synechocystis* PCC 6803 est capable de produire du H₂ de manière faible et transitoire grâce à une hydrogénase [NiFe] bidirectionnelle Hox. Cette enzyme possède 5 sous-unités protéiques (HoxEFUYH) qui catalysent la réaction réversible : $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$. Le site actif [NiFe] de cette enzyme est assemblé par un complexe de six protéines HypABCDEF. L'hydrogénase est ensuite maturée par une protéase HoxW qui clive la sous-unité HoxH et active le site catalytique [NiFe].

L'ingénierie de cyanobactéries pour la photoproduction biologique d'H₂ passe par une meilleure compréhension du rôle de l'hydrogénase dans le métabolisme cyanobactérien. Au cours de ma thèse, j'ai construit et analysé 7 mutants sophistiqués de *Synechocystis* permettant la surexpression simultanée (constitutive ou régulée par la température de croissance) des gènes *hoxEFUYHW* et *hypABCDEF*. On a ainsi montré que la surproduction simultanée des protéines HoxEFUYHW et HypABCDEF combinée à une augmentation de la disponibilité de nickel dans le milieu conduit à une augmentation de l'activité hydrogénase d'un facteur 20. D'autre part, un mutant dépourvu de l'opéron *hoxEFUYH* a permis également de montrer que l'hydrogénase n'est pas indispensable à la croissance dans les conditions photoautotrophiques standard. La comparaison des phénotypes des divers mutants construits durant ce travail a permis également de montrer pour la première fois que l'hydrogénase joue un rôle dans la défense cellulaire contre le stress oxydant induit par le H₂O₂, par la présence de glucose ou de glycérol dans le milieu de culture. Par ailleurs, j'ai participé à la caractérisation d'un nouveau régulateur de l'expression de l'hydrogénase. Ce facteur de transcription (AbrB2) qui réprime l'opéron *hoxEFUYH* est impliqué dans la tolérance au stress induit par le diamide ou le nickel. Un contrôle redox de l'activité de ce régulateur par une modification post-traductionnelle de glutathionylation a été mise en évidence pour la première fois chez les cyanobactéries.

L'ensemble de ces résultats démontre que l'on doit combiner plusieurs stratégies génétiques et physiologiques pour augmenter fortement la production d'hydrogène chez *Synechocystis*, et que nos mutants sont des outils très importants vers cet objectif.

Mots clés: Cyanobactérie, *Synechocystis* sp. PCC6803, Hydrogène, Hydrogénase, Photoproduction, Régulation, Assemblage et Maturation de l'hydrogénase, AbrB, Biocarburants, Bioénergies, Glutathionylation, Stress oxydant, Stress glycolitique.